

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11)特許出願公表番号

特表平11-501809

(43)公表日 平成11年(1999)2月16日

| (51)Int.Cl. <sup>8</sup> | 識別記号 | F I           |        |
|--------------------------|------|---------------|--------|
| C 1 2 N 15/09            |      | C 1 2 N 15/00 | A      |
| A 6 1 K 39/00            | AD X | A 6 1 K 39/00 | AD X J |
| 39/395                   | AB E | 39/395        | AB EN  |
|                          | AC D |               | AC DD  |
| C 0 7 K 14/30            | Z NA | C 0 7 K 14/30 | Z NA   |

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 49 頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願平8-527121  
 (86)(22)出願日 平成8年(1996)3月15日  
 (85)翻訳文提出日 平成9年(1997)9月11日  
 (86)国際出願番号 PCT/AU96/00149  
 (87)国際公開番号 WO96/28472  
 (87)国際公開日 平成8年(1996)9月19日  
 (31)優先権主張番号 PN1789  
 (32)優先日 1995年3月16日  
 (33)優先権主張国 オーストラリア (AU)

(71)出願人 ザ・ユニバーシティ・オブ・メルボルン  
 オーストラリア・ビクトリア3052パークビル・グラツタンストリート  
 (72)発明者 ウォーカー, ジョン  
 オーストラリア・ビクトリア3103バルウィン・クラブアムストリート26  
 (72)発明者 リー, ローガン  
 オーストラリア・クイーンズランド4069チヤベルヒル・グリーンフオードストリート73  
 (74)代理人 弁理士 小田島 平吉

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 マイコプラズマに対する抗原組成物

## (57)【要約】

本発明は、マイコプラズマ (*Mycoplasma*) の試料、;マイコプラズマ (*Mycoplasma*) に対する少なくとも一つの抗体を含む抗体プローブ (その抗体プローブは:免疫動物を、感染部位もしくは病変領域または感染部位もしくは病変に近接する領域から採取されたマイコプラズマ (*Mycoplasma*) もしくはマイコプラズマ (*Mycoplasma*) 抽出物で攻撃誘発させた後、短時間の内に採取された生物学的試料を提供し;その生物学的試料から細胞を単離し;細胞を適切な培養培地中でインビトロで培養し;そして前記細胞から産生される抗体を回収することを含む方法により産生される) を提供し;そのマイコプラズマ (*Mycoplasma*) の試料を抗体プローブで探索して少なくとも一つの抗原を検出し;そして検出された抗原を単離することを含む方法により調製される、マイコプラズマ (*Mycoplasma*) に対する仮想的防護抗原に関し、そして更には診断用抗原、その調製法、およびワクチン組成物、特にマイコプラズマ ヒオプネウモニアエ (*Mycoplasma hyopneumoniae*)

| 10         | 20         | 30         | 40         | 50          |
|------------|------------|------------|------------|-------------|
| 1234567890 | 1234567890 | 1234567890 | 1234567890 | 1234567890  |
| MKKMLRKKFL | YSSAIYATSL | ASIIAFVAAG | CGQTESGSTS | DSKPOAETLK  |
| HKVSNDSIRI | ALTDPNFRW  | ISAQRDIISY | VDETEAATST | ITKNQDAQNN  |
| WLTQOANLSP | APKGFILAPE | NGSGVGTAVN | TIADKGIPIV | AYDRLLITGSD |
| KYDWYVSFDN | EKVGELQGLS | LAAGLLGKED | GAFDSIDQMN | EYLSKSEMPQE |
| TISFYTIAGS | QDDNNSQYFY | NGAMKVLKEL | MKNSQNKIID | LSPEGENAVY  |
| VPGNNYTAG  | QRIQSFLTIN | KDPAGGNKIK | AVGSKPASIF | KGFLAPNDGM  |
| AEQAITKLKL | EGFDTQKIFV | TRQDYNDKAK | TFIKDGDQNM | TIYKPKVLS   |
| KVAVEVLRLV | IAKGNKASRS | EVENELKAKL | PNISFKYDNO | TYKVQGNIN   |
| TILVSPVTVT | KANVDNPDPA |            |            | 419         |

FIG. 7

## 【特許請求の範囲】

1. マイコプラズマ (*Mycoplasma*) に対する仮想的防御抗原であつて、

マイコプラズマ (*Mycoplasma*) の試料；

マイコプラズマ (*Mycoplasma*) に対する少なくとも一つの抗体を含む抗体プローブ（その抗体は：

免疫動物を、感染部位もしくは病変領域または感染部位もしくは病変に近接する領域から採取されたマイコプラズマ (*Mycoplasma*) もしくはマイコプラズマ (*Mycoplasma*) 抽出物で攻撃誘発させた後、短時間の内に採取された生物学的試料を提供し；

その生物学的試料から細胞を単離し；

細胞を適切な培養培地中でインビトロで培養し；そして

前記細胞から産生された抗体を回収することを含む方法により産生される

）

を提供し；

そのマイコプラズマ (*Mycoplasma*) の試料を抗体プローブで探索して少なくとも一つの抗原を検出し；そして

検出された抗原を単離することを含む方法により調製される上記仮想的防御抗原。

2. マイコプラズマ (*Mycoplasma*) がマイコプラズマヒオプネウモニアエ (*Mycoplasma hyopneumoniae*) である、請求の範囲1に記載の仮想的防御抗原。

3. 本明細書中に記載される110～114、90～94、72～

75、60～64、52～54、および46～48キロダルトン (kD) のおおよその分子量を有する抗原群より選択されるマイコプラズマ ヒオプネウモニアエ (*Mycoplasma hyopneumoniae*) もしくは関連感染に対する仮想的防御抗原、その突然変異体、誘導体、および断片。

4. 表面蛋白質である、請求の範囲3に記載の仮想的防御抗原。

1.3. 以下の内部アミノ酸配列：

TTYKPKDKVLGKVAVEVLRLVIAKKKNKASR  
AEQAATKLLKLEGFDTQ  
KNSQNKIDLSPEG

の内の一つもしくは複数を更に含む、請求の範囲12に記載の仮想的防御抗原。

1.4. マイコプラズマ ヒオプネウモニアエ (*Mycoplasma hyopneumoniae*) もしくは関連感染に対する仮想的防御抗原をコードする、以下の配列、その突然変異体、誘導体、組換え体、および断片：

5. 表面リポ蛋白質もしくは膜蛋白質である、請求の範囲3もしくは4に記載の仮想的防御抗原。

6. 110～114、90～94、74、62、52、および48kDのおおよその分子量を有する請求の範囲3～5の内のいずれか一つに記載の仮想的防御抗原。

7. 72～75kD領域内の抗原が以下のN-末端アミノ酸配列：

AGXLOKNSLLEEVWYAL

を含む、請求の範囲3に記載の仮想的防御抗原。

8. 以下のN-末端アミノ酸配列：

AKNFDFAPIQGYKKIAHEL  
NLKPEQILQLLG  
LLKAEXNKXIEINTXLDN

の内の一つもしくは複数を更に含む、請求の範囲7に記載の仮想的防御抗原。

9. 60～64kD領域内の抗原が以下のN-末端アミノ酸配列：

MKLAKLLKGFX(NL)(M/V)IK  
ADP(F/I)(R/E)Y(V/A)PQG(Q/A/X)(M/N)V

を含む、請求の範囲3に記載の仮想的防御抗原。

10. 52～54kD領域内の抗原が以下のN-末端アミノ酸配列：

AGXWAKETTKEEKS

を含む、請求の範囲3に記載の仮想的防御抗原。

11. 以下のN-末端アミノ酸配列：

AWWTADGTVN  
AIVTADGTVNDNKPQWVRKY

の内の一つもしくは複数を更に含む、請求の範囲10に記載の仮想的防御抗原。

12. 46～48kD領域の抗原が以下のN-末端アミノ酸配列：

AGXGQTESG6TSDSKPQAETLKHKV

を含む、請求の範囲3に記載の仮想的防御抗原。

| 10          | 20          | 30          | 40          | 50               |
|-------------|-------------|-------------|-------------|------------------|
| 1234567890  | 1234567890  | 1234567890  | 1234567890  | 1234567890       |
| ATGAAAAA    | TGCCCATATA  | CCAGAGGAAA  | GAGCAGTATA  | TAAAAAATT 50     |
| AAAAATTAGAT | TTTCTTCATT  | TGCCGCCAGAA | TTTCTTAAGAA | TTAGTACATT 100   |
| AAAAAGTAGA  | ACAAAAGTTA  | TTAATGTAAA  | CATTAGCGCA  | ATCCTTAAGA 150   |
| AAAAATTAAA  | AGTTTATCT   | ATTTTITTA   | ATCGAAATCC  | AACCAGGCAT 200   |
| AAATCTTTGT  | CAGTATTTAT  | CAAGTCGCTA  | TTTTTTCATT  | ATTTCTACTA 250   |
| AAATATATT   | TGAATTTGCA  | TTTTTCATAA  | TCTAAAATTT  | TACATTTTTT 300   |
| TATACCAATT  | TTTAAAAATT  | ACTCTTTAAT  | TTATAGTATT  | TTTTTATTTT 350   |
| TTAGTCTAAA  | TTATAAAAAT  | ATCTTGAATT  | TTATTTGAAT  | TTTTTAAATT 400   |
| TAGTACTAAA  | AAATACAAAT  | ATTTTTCCT   | ATTTCTAAGAA | AAATTCATTT 450   |
| TTTAAAAAAA  | ATTGATTTTT  | ATAGTATAAT  | TTGTTTGAAT  | AAATGAATTA 500   |
| ACTTGAATTG  | AAAGGGAACA  | AAATGAAAAA  | AATGCTTAGA  | AAAAAATICT 550   |
| TGTATTTCATC | AGCTATTTAT  | GCAAGTTCGC  | TTGCATCAAT  | TATTGCAATT 600   |
| GTTGCAGCAG  | GTTGTGGACA  | GACAGAAATCA | GGTCAACTT   | CTGATTTCTAA 650  |
| ACCACAAGCC  | GAGACGCTAA  | AACATAAAGT  | AGTAAATGAT  | TCTATTCTGAA 700  |
| TAGCACTAAC  | CGATCCGCTA  | AATCCTCGAT  | GAATTAGTGC  | CCAAAAAGAT 750   |
| ATTATTTCTT  | ATGTTGATGA  | AACAGAGGCA  | GCAACTTCAC  | CAATTAACAA 800   |
| AAACCAGGAT  | GCACAAATA   | ACTGACTCAC  | TCAGCAAGCT  | AAATTAAGCC 850   |
| CAGCGCCAAA  | AGGATTTATT  | ATTGCCCTG   | AAAATGGAAG  | TGGAGTTGGA 900   |
| ACTGCTGTTA  | ATACAAATGC  | TGATAAAGGA  | ATTCCGATTG  | TTCGCTATGA 950   |
| TCGACTAATT  | ACTGSAATCTG | ATAAATATGA  | TTGGTATGTT  | TCCTTTGATA 1000  |
| ATGAAAAAGT  | TGGTGAATTA  | CAAGGTCTTT  | CACITGCTGC  | GGGTCTATTA 1050  |
| GGAAAAAGAG  | ATGGTGCCTT  | TGATTCATTT  | GATCAATGTA  | ATGAATATCT 1100  |
| AAAATCACAT  | ATGCCCAAG   | AGACAATTTT  | TTTTTATACA  | ATCGCGGGTT 1150  |
| CCCAAGATGA  | TAATAATTC   | CAATATTTTT  | ATAATGGTGC  | AATGAAAGTA 1200  |
| CTTAAGAAAT  | TAATGAAAAA  | TTCCGAAAAAT | AAAATATTTG  | ATTTATCTCC 1250  |
| TGAAGGCGAA  | AATGCTGTTT  | ATGTCGCCAGG | ATGAAATTTAT | GGAACTGCCG 1300  |
| GTCAGAGAAAT | CCAATCTTTT  | CTAACAATTA  | ACAAAGATCC  | AGCAGGTGGT 1350  |
| AATAAAATCA  | AAGCTGTTGG  | TTCAAAACCA  | GCTCTATTTT  | TCAAGGATT 1400   |
| TCTTGCCCCA  | AATGATGGAA  | TGSCCGAACA  | AGCAATCACC  | AAATTAAAC 1450   |
| TTGAAGGGTT  | TGATACCCAA  | AAAATCTTTG  | TAACTCTGCA  | AGATTATAAT 1500  |
| GATAAGGCCA  | AAACTTTTAT  | CAAAGACGGC  | GATCAAAATA  | TGACAATTTA 1550  |
| TAAACCTGAT  | AAAGTTTTAG  | GAAAAGTTGC  | TGTTGAAGTT  | CTTCGGGTTT 1600  |
| TAATTTGCAAA | GAAAAATAAA  | GCATCTAGAT  | CAGAAGTCGA  | AAACGAACATA 1650 |
| AAAGCAAAAC  | TACCAATAT   | TTCAATTTAA  | TATGATAATC  | AAACATATAA 1700  |
| AGTACAAAGT  | AAAAATATTA  | ATACAATTTT  | AGTAAGTCCA  | GTAATTTGTA 1750  |
| CAAAAGCTAA  | TGTTGATAAT  | CCTGATGCCT  | AA          | 1762             |

を含む単離された核酸断片。

1.5. 抗原が以下の核酸配列、その突然変異体、誘導体、組換え体、および断片：

| 10         | 20         | 30         | 40         | 50          |
|------------|------------|------------|------------|-------------|
| 1234567890 | 1234567890 | 1234567890 | 1234567890 | 1234567890  |
| ATGAAAAA   | TGGCACTATA | CCAGAGGAAA | GAGCAGTATA | TAAATAATT   |
| AAAATTACAT | TTTCTTCAIT | TGGCCGAGAA | TTTTTAAGAA | TTAGTACATT  |
| AAAAAGTAGA | ACAAAAGTGA | TTAATGTAAA | CATTAGCGCA | ATCCTTAAGA  |
| AAAAATTAAA | AGTTTATCT  | ATTTTTTTTA | ATCGAAATCC | AACGAGGCAT  |
| AAATCTTTGT | CAGTATTAT  | CAAGTCGGTA | TTTTTTCATT | ATTTCTACTA  |
| AAATATTATT | TGATTTTGCA | TTTCCATAA  | TCTAAAAATT | TACATTTTTT  |
| TATAACAATT | TTTAAAAATT | ACTCTTTAAT | TTATAGTATT | TTTTTATTTT  |
| TTAGTCTAAA | TTATAAAATT | ATCTTGAATT | TTATTTGAAT | TTTTTAAATT  |
| TAGTACTAAA | AAATACAATT | ATTTTTCTCT | ATTCTAAGAA | AAATTCATTT  |
| TTTAAAAAAA | TTTGAATTAT | ATAGTATAAT | TTGTTTGTAT | AATTGAATTA  |
| ACCTGATTTG | AAAGGGAACA | AAATGAAAAA | AATGCTTAGA | AAAAATTTCT  |
| TGTATTCAIT | AGCTATTAT  | GCAACTTCGC | TTGCATCAAT | TATTGCATTT  |
| GTTGCGACAG | GTTGTGGAAC | GACAGATCA  | GGTTCACCTT | CTGATTCTAA  |
| ACCACAAGCC | GAGACGCTAA | AACATAAAGT | AAGTAATGAT | TCTATTGGA   |
| TAGCCTAAC  | CGATCGGAT  | AATCCTCGAT | GAATTAATGC | CCAAAAAGAT  |
| ATTATTCTT  | ATGTTGATGA | AACAGAGGCA | GCAACTTCAA | CAATTACAAA  |
| AAACGAGGAT | GCACAAAATA | ACTGACTCAC | TCAGCAAGCT | AATTTAAGCC  |
| CAGGCGCAAA | AGGATTTAT  | ATTGCCCTCG | AAAATGGAAG | TGGAGTTTGA  |
| ACTGCTGTTA | ATACAAATTC | TGATAAAGGA | ATTCCGATTG | TTGCCTATGA  |
| TCGACTAATT | ACTGGATCTG | ATAAATATGA | TTGGTATGTT | TCTTTTGATA  |
| ATGAAAAAGT | TGGTGAATTA | CAAGGTCTTT | CACCTGCTGC | GGGTCTATTA  |
| GGAAAAAGAG | ATGGTGTCTT | TGATTCAATT | GATCAATGAT | ATGAATATCT  |
| AAAATCAGAT | ATGCCCCAG  | AGACAAATTC | TTTTTATACA | ATCGCGGGTT  |
| CCCAAGATGA | TAAATATTC  | CAATATTTT  | ATATGGTGC  | AATGAAGTA   |
| CTTAAGAAAT | TAAAGAAAA  | TCGCAAAAT  | AAAATAATT  | ATTTATCTCC  |
| TGAAGGCGAA | AAGCTGTTT  | ATGTCCTGAG | ATGAATAT   | GGAAGTGGC   |
| GTCAGGAAT  | CCAATCTTT  | CTAACATTA  | ACAAAGATCC | AGCAGTGGT   |
| AAATAATCA  | AAGCTGTTG  | TGCAAAACCA | GCTTCTATT  | TCAAAAGAT   |
| TCTTGGCCCA | ATGATGGA   | TGCGCGAACA | AGCAATCACC | AGATTATAAT  |
| TTGAAGGTT  | TGATACCCA  | AAAATCTTTG | TAACCTGCTA | AGATTATAAT  |
| GATAAAGCCA | AACTTTTAT  | CAAGACGCG  | GATCAAAAT  | TGACAAATTA  |
| TAAACCTGAT | AAATTTTAG  | GAAAGTTGC  | TGTTGAAGTT | CTTCGGGTTT  |
| TAATTGCAAA | AAAAATAAA  | GCACTAGAT  | CAGAAGTGA  | AAACGAACTA  |
| AAAGCAAAAC | TACCAATAT  | TTGATTTAA  | TATGATAATC | AAACATATAA  |
| AGTACAAGGT | AAAAATTTA  | ATCAATTTT  | AGTAAGTCCA | GTAATTTGTTA |
| CAAAAGCTAA | TGTTGATAAT | CCTGATGCCT | AA         | 1782        |

を含む46～48kD領域である、仮想的防御抗原をコードする、請求の範囲14に記載の単離された核酸断片。

16. マイコプラズマ (*Mycoplasma*) に対する抗体を産生するための、

免疫動物を、感染部位もしくは病変領域または感染部位もしくは病変に近接する領域から採取されたマイコプラズマ (*Mycoplasma*)

a) もしくはマイコプラズマ (*Mycoplasma*) 抽出物で攻撃誘発させた後、短時間の内に採取した生物学的試料を提供すること；

を提供し；

抗体プローブでマイコプラズマ (*Mycoplasma*) の試料を探索して少なくとも一つの抗原を検出する；そして

検出された抗原を単離することを含む方法。

23. マイコプラズマ (*Mycoplasma*) 好ましくはマイコプラズマ ヒオプネウモニアエ (*Mycoplasma hyopneumoniae*) に関連する仮想的防御抗原を精製する、

粗精製抗原混合物；および

適切な支持体上に固定化された、マイコプラズマ (*Mycoplasma*) に対する抗体

を提供し；

その粗精製抗原混合物を、固定化させた抗体を用いる親和性クロマトグラフィーに供し；そして

そのようにして形成された精製抗原を単離することを含む方法。

24. マイコプラズマ (*Mycoplasma*) 好ましくはマイコプラズマ ヒオプネウモニアエ (*Mycoplasma hyopneumoniae*) に対する合成抗原性ポリペプチドを調製するための、

マイコプラズマ (*Mycoplasma*) の試料から取得されるcDNAライブラリーもしくはゲノムライブラリー；および

請求の範囲16に従って調製される抗体を含む抗体プローブ；

を提供し；

そのcDNAライブラリーもしくはゲノムライブラリーから合成ポリペプチドを作製し；

その合成ポリペプチドを抗体プローブで検索し；そして

それによって検出された合成抗原性ポリペプチドを単離することを含む方法。

25. 抗体プローブが、マイコプラズマ ヒオプネウモニアエ (*Mycoplasma hyopneumoniae*) もしくは関連感染に対する、本明細書に

その生物学的試料から細胞を単離すること；

細胞を適切な培養培地内でインビトロで培養すること；および

前記細胞から産生される抗体を回収することを含む方法。

17. 生物学的試料が、マイコプラズマ (*Mycoplasma*) で攻撃誘発させた後の予め決められた時期、好ましくは攻撃誘発後2～7日目に採取される、請求の範囲16に記載の方法。

18. 細胞のインビトロでの培養が更に、その培養物へのヘルパー因子の添加を含み、前記ヘルパー因子は単独もしくは組合わされて用いられるインターロイキン1、2、3、4、5、6、7、および8、コロニー刺激因子、インターフェロンを初めとするサイトカイン、ならびに特異的B細胞分泌の亢進効果を有することが示されることがある他の因子から選択される、請求の範囲16に記載の方法。

19. 抗体を増殖、および分泌および/または放出させる目的で単離された細胞を活性化させることを含む細胞活性化段階を更に含み、

前記細胞活性化段階は、培養培地に細胞活性化剤を添加することを含み、前記細胞活性化剤は本明細書に記載されるようにマイトジェンおよび白血球により産生されるヘルパー因子、またはそれらの合成等価物もしくは組み合わせ物を含む群から選択される、請求の範囲16～18の内のいずれか一つに記載の方法。

20. 抗体が、培養培地から回収された上清の形態をとる、請求の範囲16～19の内のいずれか一つに記載の方法。

21. 請求の範囲16～20の内のいずれか一つの方法に従って調製

されるマイコプラズマ (*Mycoplasma*) に対する抗体。

22. マイコプラズマ (*Mycoplasma*) 好ましくはマイコプラズマ ヒオプネウモニアエ (*Mycoplasma hyopneumoniae*) に関連する仮想的防御抗原を同定する、

マイコプラズマ (*Mycoplasma*) の試料；および

マイコプラズマ (*Mycoplasma*) に対する少なくとも一つの抗体を含む抗体プローブ；

記載される110～114、90～94、72～75、60～64、52～54、および46～48キロダルトン (kD) のおおよその分子量を有する抗原、その突然変異体、誘導体、および断片の群から選択される抗原に対して作製される抗体を含む、請求の範囲24に記載の方法。

26. N-末端アミノ酸配列：

AGXLQKNSLLEEVWYLAL

を有する請求の範囲24もしくは25に記載の方法により産生される72～75kD領域の合成仮想的防御抗原。

27. 更に内部アミノ酸配列：

AKNFDFAPSIGYKIAHEL

NLKPEQILQLLG

LLKAEXNKKIEINTXLDN

を含む、請求の範囲26に記載の合成仮想的防御抗原。

28. N-末端アミノ酸配列：

MKLAKLLKGF(NL)(M/V)IK

ADP(F/I)(R/E)Y(V/A)PQG(Q/A)(M/N)VG

を有する請求の範囲24もしくは25に記載の方法により産生される60～64kD領域の合成仮想的防御抗原。

29. N-末端アミノ酸配列：

AGXWAKETTKEEKS

を有する請求の範囲24もしくは25に記載の方法により産生される52～54kD領域の合成仮想的防御抗原。

30. 更に内部アミノ酸配列：

AWVTADGTVN

AINVTADGTVDNKNPQWWRKY

を含む、請求の範囲29に記載の合成仮想的防御抗原。

31. N-末端アミノ酸配列：

AGXGOTESGSTSDSKPOAETLKHVK

を有する請求の範囲24もしくは25に記載の方法により産生される46~48 kD領域の合成仮想的防御抗原。

32. 更に内部アミノ酸配列:

TIYKPKDKVLGKVAVEVLRVLIKKNKASR  
AEQAITKLKLEGFDTQ  
KNSQNKIDLSPEG

を含む、請求の範囲31に記載の合成仮想的防御抗原。

33. 請求の範囲1~31の内のいずれか一つに記載のマイコプラズマ

マ (*Mycoplasma*) に対する少なくとも一つの仮想的防御抗原の予防的有効量を含むワクチンもしくは獣医学的組成物。

34. 110~114、90~94、72~75、60~64、52~54、および46~48キロダルトンのおおよその分子量を有する抗原から選択される複数の仮想的防御抗原を含む、請求の範囲33に記載のワクチンもしくは獣医学的組成物。

35. 請求の範囲21に記載のマイコプラズマ (*Mycoplasma*) に対する抗体を含むワクチンもしくは獣医学的組成物。

36. 請求の範囲1~13および26~32の内のいずれか一つに記載される診断用抗原もしくはその断片を含む診断用キット。

37. マイコプラズマ (*Mycoplasma*) 感染を予防もしくは治療するための、請求の範囲1~13の内のいずれか一つに記載の少なくとも一つの仮想的防御抗原の予防的もしくは治療の有効量を動物に投与することを含む方法。

38. マイコプラズマ (*Mycoplasma*) もしくは関連感染に対する仮想的防御抗原をコードし、図6に記載の核酸配列もしくは相同配列、およびその機能的活性断片、突然変異体、変異体、もしくは組換え体を有する単離されたDNA断片。

39. 請求の範囲38に記載のDNA断片を含むクローン。

40. 本明細書中これ以前に記載のクローンpC1-2である、請求の範囲3

#### 【発明の詳細な説明】

##### マイコプラズマに対する抗原組成物

本発明は、予防用かつ診断用抗原、それらの調製法、およびワクチン組成物、特にマイコプラズマ ヒオプネウモニアエ (*Mycoplasma hyopneumoniae*) 感染に対するワクチン組成物の製剤におけるそれらの使用に関する。

マイコプラズマ ヒオプネウモニアエ (*Mycoplasma hyopneumoniae*) は、ブタにおけるマイコプラズマ肺炎 (ブタ流行性肺炎) の原因である偏在的なブタ呼吸器病原体である。ブタ流行性肺炎は世界のブタ産産国における最も広域にわたりかつ経済的に重要な疾患であるかもしれない。ブタ流行性肺炎 (SEP) によりもたらされる経済効果は多様であり、疾患に起因する出費は高額となる。オーストラリアではこの疾患は1988年には年間約20,000,000ドルにものぼると推定された。死亡率の上昇、成長に伴う体重増加率の減少、食用肉への変換効率の低下、二次性細菌感染の疑い、管理費用の上昇、および抗生物質使用量の増大がSEPの経済効果の主な理由である。

幾つかの実験的ワクチンが産生されているものの、これらは至適結果を生じるには及ばず、かつ例えばテトラサイクリン、リンカマイシン、およびチアムリンのような様々な種類の抗生物質の使用が依然として最も広汎な管理処置法となっている。しかしながら、このような抗生物質には治療効果の限界が存在し、なぜならそれらの抗生物質によっては感染の樹立は回避されず、そして治療終了後に肺病変が生じることがある

ためである。

ML Technology Ventures L. P. に与えられた欧州特許出願公開第359,919号には、36 kD、41 kD、74.5 kD、および96 kDのサイズの一連の抗原が記載されており、かつワクチンにおけるこれらの抗原の使用が提案されている。提示される結果により、攻撃誘発に対するブタの防御法の幾つかが達成されたことが示唆されている。

しかしながら依然として、M. ヒオプネウモニアエ (*M. hyopneum*

9に記載のクローン。

41. 請求の範囲38に記載のDNA断片によりコードされるアミノ酸配列もしくはその機能的等価物。

42. 図7のアミノ酸配列を有するアミノ酸配列もしくはその機能的

等価物。

43. 実施例を参考にして本明細書中これ以前に実質的に記載される仮想的防御抗原もしくは抗体。

*oniae*) での攻撃誘発後の集団感染および臨床疾患に対する防御を付与し、かつ更には二次感染からの罹患率および死亡率を有意に減少させるであろう、M. ヒオプネウモニアエ (*M. hyopneumoniae*) に対する効果的なワクチンのための技術が必要とされている。

従って、従来の技術における一つもしくは複数の問題点および欠点を克服するかもしくは少なくとも緩和させることが本発明の目的である。

従って本発明の最初の態様では、マイコプラズマ (*Mycoplasma*)、好ましくはマイコプラズマ ヒオプネウモニアエ (*Mycoplasma hyopneumoniae*) に対する仮想的防御抗原が提供され、その抗原は

マイコプラズマ (*Mycoplasma*) の試料;

マイコプラズマ (*Mycoplasma*) に対する少なくとも一つの抗体を含む抗体プローブ (その抗体プローブは:

免疫動物を、感染部位もしくは病変領域または感染部位もしくは病変に近接する領域から採取されたマイコプラズマ (*Mycoplas*

*ma*) もしくはマイコプラズマ (*Mycoplasma*) 抽出物で攻撃誘発させた後、短時間の内に採取された生物学的試料を提供し;

その生物学的試料から細胞を単離し;

細胞を適切な培養培地中でインビトロで培養し;そして

前記細胞から産生された抗体を回収することを含む方法により産生される

) を提供し;

そのマイコプラズマ (*Mycoplasma*) の試料を抗体プローブで探索して少なくとも一つの抗原を検出し;そして

検出された抗原を単離することを含む方法により調製される。

防御抗原は更には以下に論議されるように診断抗原としても機能することがあ

ってよい。

従って本発明の好ましい態様では、本明細書中これ以降に記載される110~114、90~94、72~75、60~64、52~54、および46~48

キロダルトン (kD) のおおよその分子量を有する抗原群より選択される、マイコプラズマ ヒオプネウモニアエ (*Mycoplasma hyopneumoniae*) もしくは関連感染に対する仮想的防御抗原、その突然変異体、誘導体、および断片が提供される。この仮想的防御抗原は表面蛋白質または膜蛋白質であってよい。この仮想的防御抗原は表面リポ蛋白質もしくは膜蛋白質であってよい。

この防御抗原は110~114、90~94、74、62、52、および48 kDのおおよその分子量を有する抗原群から選択される。

72~75 kDの抗原が以下のN-末端アミノ酸配列:

AGXLOKNSLLEEVWYAL

および、場合によっては以下の内部アミノ酸配列:

AKNFDAPSIQGYKKIAHEL

NLKPEOILQLLG

LLKAEKNKXIEINTXLON

の内の一つもしくは複数を含むことが好ましい。

60~64 kDの抗原が以下のN-末端アミノ酸配列:

MKLAKLLKGF(N/L)(M/V)IK

ADP(F/I)(R/E)Y(V/A)PQG(Q/A)X(M/N)VG

を含むことが好ましい。

52~54 kDの抗原が以下のN-末端アミノ酸配列:

AGXWAKETTKEEKS

および場合によっては以下の内部アミノ酸配列:

AWWTADGTVN

AVNTADGTVNDKNPNQWVRKY.

の内の一つもしくは複数を含むことが好ましい。

46~48 kDの抗原が以下のN-末端アミノ酸配列:

AGXGQTESGSTSDSKPQAE TLKHKV

および好ましくは以下の内部アミノ酸配列:

TIYKPKDKVLGKVAEVLRLVLIKKNKASR

AEQAITKLEGFDTQ

KNSQNKIIDLSPEG

の内の一つもしくは複数を含むことが好ましい。

46~48 kDの抗原は核酸断片:

| 10          | 20         | 30          | 40          | 50          |
|-------------|------------|-------------|-------------|-------------|
| 1234567890  | 1234567890 | 1234567890  | 1234567890  | 1234567890  |
| ATGAAAAA    | TGCCACTATA | CCAGAGGAAA  | GAGCAGTATA  | TAAAAAATT   |
| AAAATTACAT  | TTTCTTCATT | TGCGCCAGAA  | TTTTTAAGAA  | TTAGTACATT  |
| AAAAAGTAGA  | ACAAAAGTTA | TTAATGTAAA  | CATTAGCACA  | ATCCTTAAGA  |
| AAAAATTAAA  | AGTTTATCT  | ATTTTITTTA  | ATCGAAATCC  | AACCAGGCAT  |
| AAATCTTTGT  | CAGTATTTAT | CAAGTCGGTA  | TTTTTTCATT  | ATTCTACTA   |
| AAATATTATT  | TGAATTTGCA | TTTTTCCATA  | TCTAAAAATT  | TACATTTTTT  |
| TATAACCAAT  | TTTAAAAATT | ACTCTTAAAT  | TTATAGTATT  | TTTTTATTT   |
| TTAGTCTAAA  | TTATAAAATT | ATCTTGAATT  | TTATTGAAAT  | TTTTATAATT  |
| TAGTACTAAA  | AAATACAAAT | ATTTTTCCT   | TTATTAAGAA  | AAATTCATT   |
| TTTAAAAAAA  | ATTGATTTT  | ATAGTATAAT  | TTGTTTGAT   | AAATGAATTA  |
| ACTTGATTTG  | AAAGGGAACA | AAATGAAAAA  | AAATGCTTGA  | AAAAAATCT   |
| TGTATTCATC  | AGCTATTAT  | GCAACTTCGC  | TGSCATCAAT  | TATTGCATT   |
| GTTGCAGCAG  | GTTGTGGACA | GACAGAATCA  | GGTCAACTT   | CTGATTTAA   |
| AGCACAAGCC  | GAGACGCTAA | AACATAAAGT  | AAGTAATGAT  | TCTATTTCGA  |
| TAGCACTAAC  | CGATCCGGAT | AATCCTCGAT  | GAATTAGTGC  | CCAAAAAGAT  |
| ATTATTTCTT  | ATGTTGATGA | AACAGAGGCA  | GCACTTCAA   | CAATTACAAA  |
| AAACCCAGGAT | GCACAAAATA | ACTGACTCAC  | TCAGCAAGCT  | AATTAAAGCC  |
| CAGCGCCAAA  | AGGATTTATT | ATTGCCCTGT  | AAATGGAAG   | TGGAGTTGGA  |
| ACTGCTGTTA  | ATACAAATTC | ATTCGAGTTG  | TGATAAAGGA  | TGCTTATGA   |
| TGCACTAATT  | ACTGGAATCT | ATAAATATGA  | TTGCTTATGA  | TCCTTTGATTA |
| ATGAAAAAGT  | TGTTGAATTA | CAAGGCTCTT  | CAGGTCCTTC  | GGGCTTATTA  |
| GGAAAAAGAG  | ATGGTGCTTT | TGATTCATTT  | GATCAAAATGA | ATGAATATCT  |
| AAAAATCAGT  | ATGCCCAAG  | AGACAAATTC  | ATGCGGGGTT  | TTTATATAGA  |
| CCCAAGATGA  | TAATAATTC  | CAATATTTT   | ATAATGTTGC  | AAAGAAAGTA  |
| CTTAAAGAA   | TAATAAATTC | TTGCAAAAT   | AAATAATTC   | ATTATCTCC   |
| TGAAGGCCAA  | AAATGCTGTT | ATGTCGAGG   | ATGAATATTC  | GGAATCTCCG  |
| GTCACAAAGT  | CAATCTTTT  | CTAACAAATTA | ACAAAGATCC  | AGCAGGTGGT  |
| AATAAAATCA  | AAGCTGTTG  | TTCAAAACCA  | GCTTCTATT   | TCAAAGGAT   |
| TCTTGCCCCA  | AATGATGGAA | TGGCCGAACA  | AGCAATCACC  | AAATTAATAC  |
| TTGAAGGGTT  | TGATACCCAA | AAATCTTTG   | TAACCTGCA   | AGATTATAAT  |
| GATAAAGCCA  | AACTTTTAT  | CAAGAGCGGC  | GATCAAAATTA | TGACAAATTA  |
| TAAACCTGAT  | AAAGTTTAT  | GAAAGTTGC   | TGTTGAAGT   | CTTCGGGTTT  |
| TAATTTGCAA  | GAAAAATAA  | GCATCTAGAT  | CAGAAAGTCA  | AAACGAAGTA  |
| AAAGCAAAAC  | TACCAATAT  | TTCAATTAAT  | TATGATAAT   | AAACATATAA  |
| AGTACAAGGT  | AAAAATATTA | ATACAATTTT  | AGTAAGTCCA  | GTAATTTGTA  |
| CAAAAGCTAA  | TGTTGATAAT | CCTGATGCCT  | AA          | 1782        |

によりコードされてよい。

従って本発明の更に別の態様では、マイコプラズマ ヒオプネウモニアエ (*M*

*ycoplasma hyopneumoniae*) もしくは関連感染に対する仮想的防御抗原をコードする単離された核酸断片が提供され、前記核酸断片は:

| 10          | 20         | 30          | 40          | 50          |
|-------------|------------|-------------|-------------|-------------|
| 1234567890  | 1234567890 | 1234567890  | 1234567890  | 1234567890  |
| ATGAAAAA    | TGCCACTATA | CCAGAGGAAA  | GAGCAGTATA  | TAAAAAATT   |
| AAAATTACAT  | TTTCTTCATT | TGCGCCAGAA  | TTTTTAAGAA  | TTAGTACATT  |
| AAAAAGTAGA  | ACAAAAGTTA | TTAATGTAAA  | CATTAGCACA  | ATCCTTAAGA  |
| AAAAATTAAA  | AGTTTATCT  | ATTTTITTTA  | ATCGAAATCC  | AACCAGGCAT  |
| AAATCTTTGT  | CAGTATTTAT | CAAGTCGGTA  | TTTTTTCATT  | ATTCTACTA   |
| AAATATTATT  | TGAATTTGCA | TTTTTCCATA  | TCTAAAAATT  | TACATTTTTT  |
| TATAACCAAT  | TTTAAAAATT | ACTCTTAAAT  | TTATAGTATT  | TTTTTATTT   |
| TTAGTCTAAA  | TTATAAAATT | ATCTTGAATT  | TTATTGAAAT  | TTTTATAATT  |
| TAGTACTAAA  | AAATACAAAT | ATTTTTCCT   | TTATTAAGAA  | AAATTCATT   |
| TTTAAAAAAA  | ATTGATTTT  | ATAGTATAAT  | TTGTTTGAT   | AAATGAATTA  |
| ACTTGATTTG  | AAAGGGAACA | AAATGAAAAA  | AATGCTTGA   | AAAAAATCT   |
| TGTATTCATC  | AGCTATTAT  | GCAACTTCGC  | TTGCATCAAT  | TATTGCATT   |
| GTTGCAGCAG  | GTTGTGGACA | GACAGAATCA  | GGTCAACTT   | CTGATTTCAA  |
| AGCACAAGCC  | GAGACGCTAA | AACATAAAGT  | AAGTAATGAT  | TCTATTTCGA  |
| TAGCACTAAC  | CGATCCGGAT | AATCCTCGAT  | GAATTAGTGC  | CCAAAAAGAT  |
| ATTATTTCTT  | ATGTTGATGA | AACAGAGGCA  | GCAACTTCAA  | CAATTACAAA  |
| AAACCCAGGAT | GCACAAAATA | ACTGACTCAC  | TCAGCAAGCT  | AATTAAAGCC  |
| CAGCGCCAAA  | AGGATTTATT | ATTGCCCTGT  | AAATGGAAG   | TGGAGTTGGA  |
| ACTGCTGTTA  | ATACAAATTC | ATTCGAGTTG  | TGATAAAGGA  | TGCTTATGA   |
| TGCACTAATT  | ACTGGAATCT | ATAAATATGA  | TTGCTTATGA  | TCCTTTGATTA |
| ATGAAAAAGT  | TGTTGAATTA | CAAGGCTCTT  | CAGGTCCTTC  | GGGCTTATTA  |
| GGAAAAAGAG  | ATGGTGCTTT | TGATTCATTT  | GATCAAAATGA | ATGAATATCT  |
| AAAAATCAGT  | ATGCCCAAG  | AGACAAATTC  | TTTATATAGA  | ATGCGGGGTT  |
| CCCAAGATGA  | TAATAATTC  | CAATATTTT   | ATAATGTTGC  | AATGAAGTA   |
| TGAAGGCCAA  | TAATGAAAA  | TTGCAAAAT   | AAATAATTC   | ATTATCTCC   |
| GTCACAAAGT  | AAATGCTGTT | ATGTCGAGG   | ATGAATATTC  | GGAATCTCCG  |
| AATAAAATCA  | AAGCTGTTG  | CTAACAAATTA | ACAAAGATCC  | AGCAGGTGGT  |
| TCTTGCCCCA  | AATGATGGAA | TGGCCGAACA  | AGCAATCACC  | AAATTAATAC  |
| TTGAAGGGTT  | TGATACCCAA | AAATCTTTG   | TAACCTGCA   | AGATTATAAT  |
| GATAAAGCCA  | AACTTTTAT  | CAAGAGCGGC  | GATCAAAATTA | TGACAAATTA  |
| TAAACCTGAT  | AAAGTTTAT  | GAAAGTTGC   | TGTTGAAGT   | CTTCGGGTTT  |
| TAATTTGCAA  | GAAAAATAA  | GCATCTAGAT  | CAGAAAGTCA  | AAACGAAGTA  |
| AAAGCAAAAC  | TACCAATAT  | TTCAATTAAT  | TATGATAAT   | AAACATATAA  |
| AGTACAAGGT  | AAAAATATTA | ATACAATTTT  | AGTAAGTCCA  | GTAATTTGTA  |
| CAAAAGCTAA  | TGTTGATAAT | CCTGATGCCT  | AA          | 1782        |

である。

例えばM. ヒオリニス (*M. hyorhinis*) およびM. シノビアイ (*M. synoviae*) のような様々なマイコプラズマ (*Mycoplasma*) 間の交差防御が報告されているため、類似抗原が他のマイコプラズマ (*Mycoplasma*) 種中に検出されるこ

とがあってもよい (図1)。

更にまた別の態様では本発明は、動物のマイコプラズマ (*Mycoplasma*) 感染を予防するための方法を提供する。マイコプラズマ (*Mycoplasma*) 疾患が例えばブタ流行性肺炎 (SPE) のようなマイコプラズマ ヒオプネウモニアエ (*Mycoplasma hyopneumoniae*) 疾患であることが好ましい。この方法は、先に記載されるマイコプラズマ (*Mycoplasma*) に対する少なくとも一つの防御抗原の有効量を動物に投与することを含む。

本発明は更に、本明細書中に記載されるマイコプラズマ (*Mycoplasma*) に対する少なくとも一つの仮想的防御抗原の予防的有効量を含むワクチン組成物を提供する。この獣医学的組成物が、本明細書に記載される二つもしくはそれを上回る数の仮想的防御抗原を含むことが好ましい。

従って好ましい態様では本発明は、110~114、90~94、72~75、60~64、52~54、および46~48キロダルトンのおおよその分子量を有する抗原より選択される二つもしくはそれを上回る数の仮想的防御抗原を含むワクチン組成物を提供する。

このワクチン組成物は、110~114、90~94、72~75、60~64、52~54、および46~48 kDのおおよその分子量を有する抗原より選択される二つもしくはそれを上回る数の仮想的防御抗原のいずれかの組み合わせ物を含んでよい。二つもしくはそれを上回る数の抗原は特定されたおおよその分子量の内の一つの範囲に含まれる抗原、および/または別の特定されたおおよその分子量の抗原より選択されることがあってもよい。この組成物は、約110~114、90~

94、72~75、60~64、52~54、および46~48 kDの分子量を有する防御抗原から選択される3、4、5、もしくは6の抗原を含んでよい。

本発明に従うワクチン組成物は経口投与されてよいが、または非経口投与されてよい (例えば、筋肉内注射、皮下注射、皮内注射、もしくは静脈内注射)。必要とされる量は活性成分の抗原性と共に変化するであろうし、そして現存のワク

チンの典型的な免疫応答を誘導するに十分な量を必要とするに過ぎないであろう。

反応性実験により必要量が容易に確認されるであろう。ワクチンもしくは獣医学的組成物の典型的初回用量はおおよそ、0.01~1mg (活性成分)/kg (体重)であってよい。この用量率は増加することがあってよく、そして必要に応じ、所望されるレベルの防御を提供するのに必要とされる複数回用量が用いられてよい。

本発明に従うワクチン組成物は更には、そのワクチン組成物のための獣医学的に許容される担体、稀釈剤、もしくは賦形剤を含んでよい。活性成分は担体中に懸濁されるかもしくは溶解されてよい。担体は、動物に対して無毒性であり、かつ活性成分に適合するいずれかの固体もしくはは溶媒であってよい。適切な担体には、例えば通常の食塩水および生理学的濃度もしくはその濃度に近い他の無毒性塩のような液体担体、ならびに例えばタルクもしくはスクロースのような固形担体が含まれる。

ワクチンが例えばフロイント (Freund's) のアジュバント(完全もしくはは不完全)のようなアジュバントを含むことが好ましく、または所望される場合にはその抗原の抗原性を亢進させる目的で例えばサイトカインのような免疫調節物質が添加されることがあってよい。

そのアジュバントが、抗体力価および遅延型過敏症 (Delayed Type Hypersensitivity) 応答を誘導するという点で終始一貫して優れていることが見いだされている鉱油タイプのものであることが一層好ましい。特に好ましいアジュバントは商品名 Montanide ISA-50 として市場に出回っておりかつ Seppic 社、Paris, France、から入手することができるものである。

気管支を通して投与するのに用いる場合には、ワクチンはエアロゾルの形態で存在するのが適切である。

本発明の更に別の態様では、先に記載される要領で同定および精製される、マイコプラズマ (*Mycoplasma*)、好ましくはマイコプラズマ ヒオブネ

する抗体との間の特異反応を妨害することがあってよい。

それとは対照的に、本発明に記載されるブローブは防御免疫にとって特に重要なマイコプラズマ (*Mycoplasma*) 特異抗体中で高度に濃縮される。

生物学的試料が、その疾患の進行の際の予め決定された時期に動物から採取されることが好ましい。一般的にはマイコプラズマ (*Mycop*

*lasma*) 感染については、生物学的試料は、病原体から取得される産物での攻撃誘発もしくはその投与、または病原体自体での攻撃誘発の後約2~7日目に採取すべきであることが見いだされている。

生物学的試料から採取される細胞はB細胞を含んでよい。

従って、細胞がインビトロ刺激後の短時間の内、好ましくはその約2~5日の内に採取されることが好ましく、そうすればインビトロでのインキュベーションの後に培養地中に特異抗体を分泌するであろう抗体形成細胞のインビトロ誘導がもたらされる。

短時間前に活性化されたB細胞による培養地中への抗体のインビトロ分泌は、その培養物へのヘルパー因子の添加により促進することができる。ヘルパー因子は、インターロイキン1、2、3、4、5、6、7、および8、コロニー刺激因子、インターフェロンを初めとする単独もしくはは組合わされて用いられるサイトカイン、ならびに特異的B細胞分泌の亢進効果を有することが示されることがある他の因子であってよい。

抗体を産生する方法は、抗体を増殖、および分泌および/または放出させる目的で単離させた細胞を活性化させる別の段階を含んでよい。

この細胞活性化段階は、培養地に細胞活性化剤を添加することを含んでよい。細胞活性化剤はマイトジェンおよび白血球により産生されるヘルパー因子、またはそれらの合成誘導物もしくはは組合わせ物から選択することができる。

マイトジェンは、ボークウィッド (アメリカヤマゴボウ) (フィトラッカ アメリカナ (*Phytolacca americana*)) から取得される産物 (ボークウィッドマイトジェン (PWM) としても知られている)、ポリビニルピロリドン (PVP)、ポリアデニル酸-ポリウ

ウモニアエ (*Mycoplasma hyopneumoniae*) に対する診断用抗原を含む診断用キットが提供される。

本発明に従う仮想的防御抗原はオーストラリア特許第49035/90号 (この全開示は引用により本明細に取り込まれる) に記載される一般的方法を利用して単離および同定されることがあってよい。

従って更に別の態様では、本発明はマイコプラズマ (*Mycoplasma*) に対する少なくとも一つの抗体を産生するための方法を提供する。この方法は、免疫動物を、感染部位もしくはは病変領域または感染部位もしくはは病変に近接する領域から採取されたマイコプラズマ (*Mycoplasma*) もしくはマイコプラズマ (*Mycoplasma*) 抽出物で攻撃誘発させた後、短時間の内に採取した生物学的試料を提供すること;

その生物学的試料から細胞を単離すること;

細胞を適切な培養地内でインビトロで培養すること;および

前記細胞から産生される抗体を回収すること、を含む。

マイコプラズマ (*Mycoplasma*) はマイコプラズマ ヒオブネウモニアエ (*Mycoplasma hyopneumoniae*) であってよい。

動物はヒトを始めとする哺乳類であってよい。この哺乳類は例えばブタ、ヒツジ、もしくはウシのような家畜であってよい。

生物学的動物試料はいずれかの適切な種類のものであってよい。この生物学的試料は動物の組織、臓器、リンパ、もしくはリンパ節から採取されてよい。この生物学的試料は感染部位、その動物の肺、もしくはは形成されることがある病変領域、または感染部位もしくはは病変に近接する領域から採取されてよく、その例は肺から排出されるリンパ節である。

しかしながら血清/血漿試料は、本発明のこの態様に従う生物学的試料としては用いられない。血清/血漿試料内に見いだされる抗体の過半数はマイコプラズマ (*Mycoplasma*) の防御もしくははその特異的診断には適さないか、またはマイコプラズマ (*Mycoplasma*) に無関係であることが見いだされている。それに加え、他の血清/血漿構成成分は、病原体構成成分とそれらに対

リジル酸 (ポリ (A-U))、精製ツベルクリン (PPD)、ポリイノシン酸-ポリシチジル酸 (ポリ (I-C))、リポポリサッカライド (LPS)、ブドウ球菌生物体もしくははその産物、バクトストレプトリシン (Bactostreptolysin) O 試薬 (SLO)、スタフィロコッカス (*Staphylococcus*) ファージ溶菌物 (SPL)、エプスタイン-バー (Epstein-Barr) ウイルス (EBV)、ノカルディア (*Nocardia*) 水溶性マイトジェン (NWEM)、フィトヘマグルチニン (PHA)、コンカナバリン (Concanavalin) A (Con A)、およびデキストラン-硫酸、ならびにそれらの混合物を含む群から選択されてよい。細胞増殖剤は、B細胞増殖および/または抗体分泌を間接的にもしくはは直接もたらすいずれかの試薬であってよく、その例は固相抗-免疫グロブリンである。ヘルパー因子は、インターロイキン1、2、3、4、5、6、7、および8、コロニー刺激因子、インターフェロンを初めとするサイトカイン、ならびに単独もしくはは他の因子および試薬と組み合わせて添加される場合には、特異的B細胞増殖および/または抗体分泌の促進効果を有することが知られることがあってよい。これはいずれにしても、マイトジェン、およびヘルパー因子を初めとする細胞活性化因子の余すところのないリストを意味するのではない。

細胞のインビトロ培養は、細胞の垂集団を分離させるための前段階を伴ってか、もしくはは伴わずに実施されてよい。抗体の回収は、培養地からの上清の回収により実施されてよい。この上清は、インビトロでの培養中にこれらの細胞から分泌されるか、もしくは例えばB細胞の溶解

によってB細胞から人工的に放出される抗体を含む。抗体含有性上清を、マイコプラズマ (*Mycoplasma*) の抗原を検出するために直接用いてよいことが見いだされている。

本発明の好ましい態様では、マイコプラズマ (*Mycoplasma*) 好ましくはマイコプラズマ ヒオブネウモニアエ (*Mycoplasma hyopneumoniae*) に関連する抗原を同定するための方法が提供される。この方

法は、

マイコプラズマ (*Mycoplasma*) の試料; および

マイコプラズマ (*Mycoplasma*) に対する少なくとも一つの抗体を含む抗体プローブ;

を提供し;

抗体プローブでマイコプラズマ (*Mycoplasma*) の試料を探索して少なくとも一つの抗原を検出し; そして

検出された抗原を単離することを含む。

マイコプラズマ (*Mycoplasma*) の試料は標準的緩衝液と混合され、そしてそこに含まれる蛋白質を分離させる目的で例えば SDS-ポリアクリルアミドゲルのような標準的支持体にかけることができる (図2)。

別法では、それらの蛋白質は非イオン性洗剤 Triton X-114 (TX-114) を用いて選択されることがある。不溶性物質が遠心分離により除去されることがある。TX-114 相中に可溶性となる蛋白質はその後には沈降析出することができる (図2)。

分離蛋白質はその後にはニトロセルロース、ナイロン、もしくは他のシートに転移することができる。

適切な抗体での探索は更には、このようにして産生された産物を検出アッセイに供することを含んでよい。検出アッセイはウエスタン (Western) プロット技術を含んでよい。この検出アッセイは、免疫沈降アッセイ、放射免疫アッセイ、酵素結合免疫アッセイ、もしくは免疫蛍光アッセイであってよい (図3、4、および5)。

先に記載される要領で産生される抗体は、単に培養地から回収される上清の形態で利用することができる。別法では抗体が分離および精製することができる。

本発明の更に別の好ましい態様では培養地中に含まれる抗体が、抗体の親和性精製、好ましくは免疫親和性精製用に用いられることができる。

従って好ましい態様では、抗原を精製するための方法が提供される。この方法

種のために、複合体粗精製抽出物混合物からの充分量の特異抗原の迅速単離が可能となる。抗原 (一つもしくは複数) を取得するための親和性クロマトグラフィーの適用により、データがほとんど知られていないかもしくは全く知られていない抗原の精製に通常の生化学的技術を適用する際に遭遇することがよくある問題が回避される。更に、「分析用」親和性クロマトグラフィーの目的のためにポリクローナル抗体もしくはモノクローナル抗体を作製する必要性も未然に回避され

る。しかしながら大容量の調製にはポリクローナル抗体もしくはモノクローナル抗体の調製が必要であるかも知れない。

抗原 (一つもしくは複数) が同定されたら、分子生物学、化学的技術 (例えば、クローニング技術) を用いて無制限の量でこの抗原を産生することがあってよく、もしくは別法では同定された抗原の様々な分画に相当する合成ペプチドがワクチンを産生するための手段として用いることができる。

従って本発明の好ましい態様では、マイコプラズマ (*Mycoplasma*)、好ましくはマイコプラズマ ヒオプネウモニアエ (*Mycoplasma hyopneumoniae*) に対する合成抗原性ポリペプチドを調製するための方法が提供され、この方法は、

マイコプラズマ (*Mycoplasma*) の試料から取得される cDNA ライブラリーもしくはゲノムライブラリー; および

先に記載される抗体プローブ;

を提供し;

その cDNA ライブラリーもしくはゲノムライブラリーから合成ポリペプチドを作製し;

その合成ポリペプチドを抗体プローブで検索し; そして

それによって検出された合成抗原性ポリペプチドを単離することを含む。

cDNA ライブラリーもしくはゲノムライブラリーのいずれかが用いられてよい。cDNA ライブラリーもしくはゲノムライブラリーが、原核生物宿主 (例えば細菌) もしくは真核生物宿主 (例えば哺乳類細胞) のいずれかの中のクローン cDNA の転写および後続の発現を可能とす

は、

粗精製抗原混合物; および

適切な支持体上に固定化された、マイコプラズマ (*Mycoplasma*) に対する抗体

を提供し;

その粗精製抗原混合物を、固定化させた抗体を用いる親和性クロマトグラフィーに供し; そして

そのようにして形成された精製抗原を単離すること、を含む。

抗体は通常の方法により培養物上清プローブから取得することができる。例えば、血清もしくは血漿から免疫グロブリンを精製するのに用いられる方法 (一例では、硫酸アンモニウムでの沈殿、カプリル酸での分画、イオン交換クロマトグラフィー、または固定化させたプロテイン

G もしくはプロテイン A への結合およびそこから溶出による方法) が用いられてよい。そのようにして取得された抗体を、その後には適切な支持体 (例えば、CNBr-活性化セファロース (Sephacrose) 4B (Pharmacia 社)、Affigel (Bio-RAD 社)、もしくは蛋白質に結合することができる他の親和性クロマトグラフィー用支持体) に結合させることができる。

固定化させた抗体をその後には、親和性クロマトグラフィーによる複合体マイコプラズマ (*Mycoplasma*) 抽出物からの特異抗原の分画化および精製にかけることができる。固定化させた抗体に抗原を結合させた後には、非結合の巨大分子種をその固体支持体から、例えば 1.5M NaCl を含む緩衝液で洗い落とすことができる。その後には、その抗原を親和性カラムから、例えば 0.5~3.0M チオシアン酸ナトリウムのようなカオトロピックイオンを含む、例えば低 pH もしくは高 pH の緩衝液 (一種類もしくは複数の種類) で溶離させることができる。

抗体プローブを親和性クロマトグラフィーに適用させることにより、生化学的特徴決定、アミノ酸配列決定、および限定防御の研究のための動物のワクチン接

るであろう適切な発現ベクター内に組み込まれることがあってよい。プローブは好ましくは、

(i) 先に記載される要領で同定および精製される抗原のアミノ酸配列に基づく合成オリゴヌクレオチドプローブ;

(ii) 先に記載される要領で産生される培養地から取得される抗体;

(iii) 先に記載される要領で同定および精製される抗原に対して産生されるモノクローナル抗体もしくはポリクローナル抗体;

(iv) 例えば Ward ら、*Nature*, 241, ページ 544-546 (1989) に記載される、抗原に対して特異性を示す組換えもしくは合成のモノクローナル抗体もしくはポリペプチド;

から選択してもよい。

本発明に従って産生される合成抗原性ポリペプチドは合成抗原性ペプチドおよび他の蛋白質を含む融合蛋白質であってよい。

本発明の更に別の態様では、マイコプラズマ (*Mycoplasma*) もしくは関連感染に対する仮想的防御抗原をコードする DNA 断片が提供され、前記 DNA 断片は図 6a および図 6b に従う核酸配列、もしくはその相同配列および機能的活性断片を有する。

本発明の更に別の好ましい態様では、マイコプラズマ (*Mycoplasma*) もしくは関連感染に対する仮想的防御抗原をコードする DNA 断片を含むクローンが提供され、前記 DNA 断片は図 6a および図 6b に従う核酸配列、もしくはその相同配列および機能的活性断片を有する。

そのクローンは pC1-2 であることが好ましい。

本発明はここで、付随する実施例および図面を参照すると一層完全に記載されるであろう。しかしながら今後の記述は単に説明を目的とするものであって、いかなる場合においても先に記載される本発明の一般性における制限として見なされるべきでないことは理解されるべきである。

図面の説明:

図1: 各種のマイコプラズマの SDS 抽出物の SDS-ポリアクリルアミドゲル

(12.5%) (クーマシー-R250染色させたもの)の解説。

レーン1 予備染色させた分子量標準 (Molecular Weight Standards)。

レーン2 M. ガリセプティクム (*M. gallisepticum*)。

レーン3 M. シノビアエ (*M. synoviae*)。

レーン4 M. ヒオブネウモニアエ (*M. hyopneumoniae*)。

レーン5 M. ヒオリニス (*M. hyorhinis*)。

レーン6 M. フロクラレ (*M. flocculare*)。

図2: M. ヒオブネウモニアエ (*M. hyopneumoniae*) の株の抽出物のSDS-ポリアクリルアミドゲル (12.5%) (クーマシー-R250染色させたゲル) の解説。

レーン1 予備染色させた分子量標準 (Molecular Weight Standards)。

レーン2 M. ヒオブネウモニアエ (*M. hyopneumoniae*) 一株BeaufortのTriton X-114抽出物。

レーン3 レーン2と同一

レーン4 M. ヒオブネウモニアエ (*M. hyopneumoniae*) 一株BeaufortのSDS抽出物。

レーン5 M. ヒオブネウモニアエ (*M. hyopneumoniae*) 一株10110のSDS抽出物。

図3: M. ヒオブネウモニアエ (*M. hyopneumoniae*) 一株BeaufortからTriton X-114で抽出し、血清および血清抗体ブローで検査した抗原のウェスタン (Western) プロット。

レーン1 抗体対照なし。

レーン2 ドーキー (Dookie) ブタ血清対照 (1/200)。

レーン3 ブタ (Pig) 105血清。

レーン5 a) ドーキー (Dookie) 血清。

b) ドーキー (Dookie) 血清 (1/100)。

レーン6 抗体対照なし。

図6: 48kの全遺伝子配列。

図7: 48kの遺伝子配列のtHE 48kDaの蛋白質配列。

#### 実施例1

マイコプラズマ ヒオブネウモニアエ (*Mycoplasma hyopneumoniae*) 用培地

フリス (Friss) 培地

Hovind-Hougen, K., Friss, N.F., Research in Veterinary Science, 1991, 51, pp 155-163, "Morphological & Ultrastructural Studies of *M. flocculare* and *M. hyopneumoniae* in vitro".

250ml ハンクス (Hanks) BSS

140ml 水

1.5グラム 脳心臓抽出液 (ブレイン-ハートインフュージョン (Brain Heart Infusion))

1.6グラム PPLOブイオン w/o CV

120℃、20分間のオートクレーブ処理

18ml イーストエキストラクト (Yeast Extract) (750ml中の100g YSC-2 Sigma社)

3.7ml 0.2% DNA (0.1% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>中)

5.14ml 1%-NAD

0.6ml 1% フェノールレッド (Phenol red)

pH7.3~7.4に調節せよ

0.45μm、0.2μmの膜を通過させて濾過し、4℃下に保存せよ。

20%になるまで滅菌したウマ (Horse) もしくはブタ (Pig) 血清を添加し、そして

使用前に抗生物質 (Antibiotics) を添加せよ。

レーン4 ブタ (Pig) 1血清。

レーン5 ドーキー (Dookie) ブタ血清。

図4: M. ヒオブネウモニアエ (*M. hyopneumoniae*) 一株BeaufortからSDSで抽出し、血清および血清抗体ブローを共に用いて探索した抗原のウェスタン (Western) プロット。

レーン1 a) ブタ (Pig) 453血清。

b) ブタ (Pig) 453血清 (1/100)。

レーン2 a) ブタ (Pig) 105血清。

b) ブタ (Pig) 105血清 (1/100)。

レーン3 a) ブタ (Pig) 1血清。

b) ブタ (Pig) 1血清 (1/100)。

レーン4 a) ブタ (Pig) 血清。

b) ブタ (Pig) 血清 (1/100)。

レーン5 a) ドーキー (Dookie) 血清。

b) ドーキー (Dookie) 血清 (1/100)。

レーン6 抗体対照なし。

図5: M. ヒオブネウモニアエ (*M. hyopneumoniae*) 一株BeaufortからSDSで抽出し、血清および血清抗体ブローを共に用いて探索した抗原のウェスタン (Western) プロット。SDSポリアクリルアミドゲル (10.0%) 上での抗原の分離。

レーン1 a) ブタ (Pig) 453血清。

b) ブタ (Pig) 453血清 (1/100)。

レーン2 a) ブタ (Pig) 105血清。

b) ブタ (Pig) 105血清 (1/100)。

レーン3 a) ブタ (Pig) 1血清。

b) ブタ (Pig) 1血清 (1/100)。

レーン4 a) ブタ (Pig) 15血清。

b) ブタ (Pig) 15血清 (1/100)。

#### エーテリッジ (Etheridge) 培地

Etheridge, J.R., Cottew, G.S., Lloyd, L.C., Australian Veterinary Journal, 1979, August 55, pp 356-359, "Isolation of *Mycoplasma hyopneumoniae* from lesions in experimentally infected pigs".

| 物質  | 600mlに対する量 |
|---|------------|
| ハンクス (Hanks) BSS                                  | 18.9ml     |
| ハートレイズ-ディグスト (Hartleys Digest) ブイオン               | 1.28グラム    |
| 心臓抽出液 (Heart Infusion) ブイオン                       | 1.65グラム    |
| ラクトアルブミン加水分解産物                                    | 2.21グラム    |
| グルコース   | 4.41グラム    |
| イーストエキストラクト (Yeast Extract) 自己溶解物                 | 8.82ml     |
| ブタ (Pig) 血清 (濾過したもの)                              | 163ml      |
| 1% NAD  | 6.17ml     |
| 1% フェノールレッド (Phenol red)                          | 1.32ml     |
| 0.2% DNA (0.1% Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> 中) | 4.41ml     |

・ MQ水 (約350~400ml) で600mlにメスアップせよ。

pHを7.4に調節し、そして: 3.0μm、0.8μm、0.45μm、0.2μmを通して濾過せよ。

4℃に保存せよ。

#### 免疫メスブタの開発

メスブタおよびナイーブな (抗原接触未経験の) 若いメスブタ (ドーキー (Dookie) と表示されるつがわっていないメスブタ) を選定



せよ。

様々な時期に、培養物として育成されたM. ヒオプネウモニアエ (*M. hyopneumoniae*) と肺ホモジネートとで攻撃誘発せよ。投与は鼻内および気管内で実施せよ。攻撃誘発期間—1991年9月～1992年1月21日。

チアムリン抗生物質を1992年1月31日～1992年2月4日まで投与した。約8週間休止期間を置いた。

#### 感染性攻撃誘発

M. ヒオプネウモニアエ (*M. hyopneumoniae*) 株Beaufortの120mlの凍結培養物を遠心分離により沈降させ(12,000×g、20分)そして50mlの完全培地中に再懸濁させ、そして37℃で一晩培養させた。一晩培養させたこの培養物を遠心分離(12,000×g)20分)にかけ、そしてマイコプラズマ(*Mycoplasma*)細胞を10mlの無血清マイコプラズマ(*Mycoplasma*)培養培地中に再懸濁させた。濃縮させたマイコプラズマ10mlを、接種物が気管内に確実に挿入されるようにカテテルを通じて、麻酔を施した免疫メスブタに投与した。

攻撃誘発後3～4日目にメスブタを屠殺し、そして肺に排出されるリンパ節を採取した(これらのリンパ節には、左右の気管支リンパ節および気管分岐部に位置するリンパ節が含まれる)。

抗体プローブをブタリンパ節から調製し、そしてこれを利用して、先に引用されるオーストラリア特許第49035/90号に記載される仮想的防御抗原を検出した。分離細胞培養物は個々のリンパ節から取得した。培養物上清は培養後5日目に回収した。

#### 抗原の調製

マイコプラズマ ヒオプネウモニアエ (*Mycoplasma hyopneumoniae*) 株Beaufortをエーテリッジ(Etheridge)培地内で、pHが6.8と7.0との間に減少するまで培養した。M. ヒオプネウモニアエ (*M. hyopneumoniae*) の細胞を、12,000×gで20分間の遠心分離により培養物から回収し、滅菌したPBSもしくは0.25

M. NaClのいずれかで4回洗浄し、そしてその後にベレット化させた細胞を以下の方法の内の一つで抽出した。

#### (i) ドデシル硫酸ナトリウム(SDS)

細胞ベレットを0.2% SDS中に再懸濁させ、そして37℃で2時間抽出した。不溶性物質を12,000×gで10分間、その抽出物からベレット化させ、そして可溶性抽出物をSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)上で泳動させた。

#### (ii) Triton X-114

Bordier (J. Bio. Chem. 1981, 256:1604-1606)の方法を用いて、非イオン性洗剤Triton X-114を用い、膜蛋白質を選択的に抽出した。

細胞ベレットを冷却PBS中に2mg/ml(蛋白質)になるまで再懸濁させ、そして予備濃縮させたTriton X-114の冷却溶液を添加して1%(v/v)最終濃度のTX-114とした。抽出は、緩やかな攪拌を伴う4℃での一晩のインキュベーションにより達成された。不溶性物質は12,000×gでの20分間の遠心分離により除去した。Triton X-114可溶性膜蛋白質をその後、37℃での相分

離を達成することにより取得した。

TX-114相に可溶性蛋白質を、担体であるデキストラン(80,000分子量)の存在下、-70℃で80%エタノールを用いて一晩沈降させた。蛋白質を12,000×gでの30分間の遠心分離により回収し、そして4M尿素中500μg/mlになるまで溶解させた。

#### 抗原の同定

6つの抗原が既述の技術を用いて同定された。同定された抗原は、免疫培養物およびドーキー(Dookie)という若メスブタから抗体プローブにより同定されたものと一致すると同定された。この結果が表1にまとめられている。

表 1

| 分子量(kD) | 特 徴                                 |
|---------|-------------------------------------|
| 110~114 | SDS抽出されたもの                          |
| 90~94   | SDS抽出されたもの                          |
| 72~75   | Triton X-114抽出されたもの                 |
| 60~64** | SDS抽出されたもの。Triton X-114抽出物の水相への分配物。 |
| 52~54   | Triton X-114抽出されたもの                 |
| 46~48   | Triton X-114抽出されたもの                 |

\*\* おおよそその分子量62kDの2つの抗原が同定された。

#### 分子量(kD) アミノ酸配列

|       |   |
|-------|---|
| 46-48 | 48 K N- 末端 : AGXGQTESGSTSDSKPQAETLKHKV<br>48 K CNBR F 1: TIYPDKVLGKVAEVLRLVLIKKNNKASR<br>48 K CNBR F 2: AEQAITKLKLGFDTO<br>48 K CNBR F 3: KNSQNKIDLSPEG |
| 52-54 | 52 K N- 末端 : AGXWAKETTKEEKS<br>52 K CNBR F 1: AWWTADGTVN<br>52 K CNBR F 2: AVTADGTVNDNKPQWVRKY  |
| 60-64 | 62 K N- 末端 : MKLAKLLKGFX (N/L)(M/V)IK   |
| 60-64 | 62 K N- 末端 : ADP(F/I)(R/E)Y(V/A)PQG(Q/A)X(M/V)VG  |
| 72-75 | 74 K N- 末端 : AGXLQKNSLLEEVWYLAL<br>74 K CNBR F 1: AKNFDFAPSIQGYKKIAHEL<br>74 K CNBR F 2: NLKPEQILQLLG<br>74 K CNBR F 3: LLKAEXNKXIEINTXLDN              |

CNBR-臭化シアン断片

Xは決定されなかったアミノ酸を表す。

(A/B) —AもしくはBであってよい残基。

#### 48 kDaの遺伝子のPCR

ポリメラーゼ連鎖反応(Polymerase Chain Reaction) (PCR) 用オリゴヌクレオチドプライマーを、N-末端および臭化シアン(CNBr)由来の内部ペプチドから取得されたアミノ酸配列から設計した。重複度の高い位置ではイノシン(I)での置換

を施した。以下のプライマーが、Bartlett Gene Machine Roboticサーマルサイクラー装置内で実施される標準的PCRアッセイで用いられた。

Oligo 48 K CNBr F 1: ACIAACGACGAGAAGCCICAGGC

T T A A A

Oligo 48 K CNBr F 2: TTIAGCTTGTGATIGCCCTGCTC

A T A T T

T

Oligo 48 K CNBr F 3: AGGTCGATGATCTTCCAICC

AA A A T T

T T

得られるPCR産物は、1.5%アガロースゲル上で可視化させ、切り出し、そしてPrep-a-Gene (BioRad社)を用いて精製した。これらを標準技術によりジデオキシ末端を有するT-ベクター(Holton and Graham, Nucleic Acids Research 19:1156, 1991)内にクローン化させ、そして核酸配列を決定した。先に示されるプライマーF1およびF2を用いる反応から取得されたPCR産物は約810塩基対のものであり、そして配列決定により、精製された天然の46~48kDaの蛋白質につき既に決定されていたアミノ酸配列をコードすることが示された。

#### 48 kDaの遺伝子のゲノムクローンの単離

48 kDaの遺伝子および48 kDaの蛋白質の全体(図6および7)を単離およ

び配列決定した。この遺伝子は、ゲノムDNAを制限酵素C<sub>LA</sub> Iで消化させ、そしてその断片をベクターpBluescript

(Stratagene社)内に連結させることにより作製されたM. ヒオブネウモニアエ (*M. hyopneumoniae*) のゲノムライブラリーから取得された。連結させた産物を、その後には大腸菌 (*Escherichia coli*) 株SURE (Stratagene社)内に電気穿孔により挿入させ、そして細胞を100pg/mlのアンプシリン (Ampicillin) を含むルリア (Luria) ブイヨンアガープレート (LB-Amp) 上でプレート培養した。このライブラリーを48kDaの蛋白質に特異的なポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) 産物とのDNAハイブリダイゼーションによりスクリーニングした。陽性クローンをLB-Amp内で増殖させ、その細胞を回収し、そしてDNAを単離し、そして確認のために部分配列決定を実施した。陽性クローンpC1-2の完全な配列決定を実施し、そして蛋白質配列を演繹した。この配列を48kDaの蛋白質のN-末端および臭化シアン断片から取得される蛋白質配列と比較したところ、この遺伝子は所望される蛋白質をコードすることが見いだされた。

#### アジュバントの選択

5〜7週令の若ブタを、同定された抗原 (一つもしくは複数) で免疫した。この抗原はTriton X-114抽出物、ならびに46〜48、52〜53、60〜64、70〜75、90〜94、および110〜114kDの同定された蛋白質を、単独もしくは組み合わせでのいずれかで含む。5〜100μgの間の蛋白質を含む抗原の免疫化用量がアジュバントと組合わされて筋肉内注射により投与された。アジュバントは、

(i) Seppic Montanide ISA-50

(ii) Quill Aおよび他のサポニン誘導体

(iii) 例えばBayol F/Arlacel Aのような鉱油を利用する水中油型エマルジョン

表 2

| 群               | 動物<br>番号 | 24時間後の<br>DTH応答 | 48時間後の<br>DTH応答 | 抗体レベル<br>(450nm) |
|-----------------|----------|-----------------|-----------------|------------------|
| 対照<br>(ワクチン非接種) | 19       | 0               | 0               | 0.061            |
|                 | 11       | 0               | 0               | 0.010            |
|                 | 1        | -               | -               | 0.005            |
|                 | 15       | 0               | 0               | 0.038            |
|                 | 7        | 0               | 0               | 0.005            |
| QUILA           | 18       | +               | 0               | 0.753            |
|                 | 25       | +               | 0               | 0.788            |
|                 | 17       | 0               | 0               | 0.638            |
|                 | 168      | -               | ±               | 0.642            |
|                 | 169      | +++             | 0               | 0.316            |
| 植物油             | 22       | 0               | 0               | 0.621            |
|                 | 4        | +               | 0               | 0.666            |
|                 | 6        | +               | +               | 0.239            |
|                 | 13       | +++             | ++              | 0.457            |
|                 | 14       | +++             | ++              | 1.086            |
| 鉱油              | 5        | +++             | ++              | 1.024            |
|                 | 23       | +++             | +               | 0.864            |
|                 | 16       | +++             | 0               | 0.975            |
|                 | 21       | +               | ±               | 0.954            |

表2: ブタにおける抗体レベルおよびDTH応答は、M. ヒオブネウモニアエ (*M. hyopneumoniae*) からの抗原の第3回目の注射の後2週間目に測定した。(— = 応答なし; ± = 微かな発赤; + = 微かな発赤および浮腫; ++ = 発赤; +++ = 発赤を伴うもしくは伴わない浮腫)。

(vi) 乳化剤としてのレシチンと共に例えばトウモロコシ油、ペニバナ油、もしくは他のもののような植物油を利用する水中油型のエマルジョン、

(v) 水酸化アルミニウムゲル、および

(vi) 例えばBASF社 (U. S. A.) により産生されるPluronic F-127のような非イオン性ブロック重合体、から選択される。

免疫化用量は2〜4週間の間隔で投与され、用量回数はアジュバントおよび抗原量に依存するが、ただし2〜3回の用量が投与されることが好ましい。

アジュバントは、ELISAにより測定される際の、抗体力価を誘導する能力に基づき、かつ遅延型過敏症 (Delayed-Type Hypersensitivity) (DTH) 反応により検査される誘導性の細胞媒介性免疫の評価により検査した。

この結果により、抗体力価およびDTH応答を誘導するという点では鉱油タイプのアジュバントが終始一貫して優れていることが明白に示された (表2)。特に、商品名Montanide ISA-50として市場に出回り、かつSeppic社、Paris、France、から入手することが可能なアジュバントが適切であることが見いだされた。

#### 豚舎防御試験

6週令の9頭の若ブタの群れを、以下の表3に示されるように精製された抗原および半精製された抗原で免疫化させた。これらの抗原は、アセトニトリル濃度勾配液を用いる酸溶媒系を用いる逆相HPLC上で精製した。

抗原は、鉱油アジュバント中に取り込ませる前に4モル尿素中に可溶化させた。

。

免疫化スケジュールは表2に示されるとおりである。

表 3

マイコプラズマ ヒオブネウモニアエ (*Mycoplasma hyopneumoniae*) の抗原の豚舎試験のためのプロトコール

#### ワクチン接種および採血

| 処 置         | 日 数 |
|-------------|-----|
| 第1回目のワクチン接種 | 0   |
| 第2回目のワクチン接種 | 14  |
| 第3回目のワクチン接種 | 50  |
| 感染性攻撃誘発     | 64  |
| 屠殺          | 91  |

#### 抗原の用量

部分精製したもの 第1回目および第2回目のワクチン接種時。

50μg 複合抗原/用量

62kD 第3回目のワクチン接種時。

220μg 部分精製抗原/用量

(精製された) 74+52kD

第1回目のワクチン接種時。

20μgの合計蛋白質量/用量

第2回目のワクチン接種時。

13μgの合計蛋白質量/用量

第3回目のワクチン接種時。

表 4

マイコプラズマ ヒオブネウモニアエ (*Mycoplasma hyopneumoniae*) の抗原の豚舎試験

| 群       | 肺炎非発症<br>動物数(%) | 平均肺病変<br>評点値 | %減少率<br>(平均値からのもの) |
|---------|-----------------|--------------|--------------------|
| 対照      | 1(11)           | 13           | 0%                 |
| 62kD    | 0(0)            | 5            | 61%                |
| 74+52kD | 3(33)           | 6.75         | 48%                |
| 48kD    | 2(22)           | 6.25         | 52%                |

## 引用文献

Warren H.S. and Chedid, L.A., Future Prospects for Vaccine Adjuvants C  
RC Critical Reviews in Immunology 8:83-108, 1988.

最後に、様々な他の変法および/または変更が本明細書にその概略が

記載される本発明の真髄を逸脱することなく作製されることがあってよいことが  
理解されるべきである。

17  $\mu$ g の合計蛋白質質量/用量  
(精製された) 48kD  
第1回目のワクチン接種時。  
20  $\mu$ g/用量  
第2回目のワクチン接種時。  
18  $\mu$ g/用量  
第3回目のワクチン接種時。  
27  $\mu$ g/用量  
全ての蛋白質評価は「BCA」蛋白質アッセイ (Pierce社、Illinois, U. S. A) により実施した。

マイコプラズマ ヒオブネウモニアエ (*Mycoplasma hyopneumoniae*) での感染からの防御は、最終免疫化の後2週間目の感染性攻撃誘発により評価した。感染性攻撃誘発は、感染させた肺から調製された10% (w/v) 肺ホモジネート10mlの鼻内投与により、そして予め感染させてある若ブタと一緒に検査用の若ブタを居住させることにより達成した。感染性攻撃誘発後4週間目に動物を屠殺し、そして肺病変の広さおよび程度を評価した (表4)。

【図1】

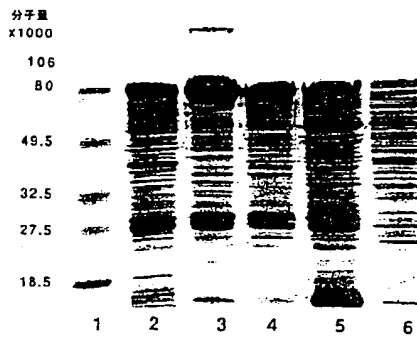


FIG. 1

【図3】

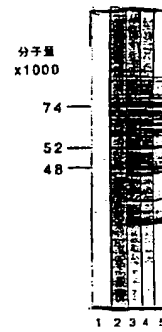


FIG. 3

【図2】

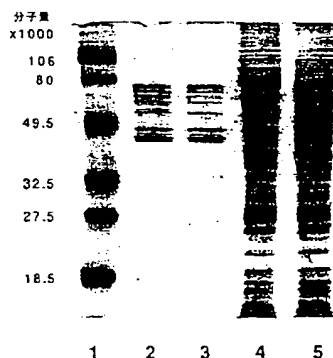


FIG. 2

【図4】

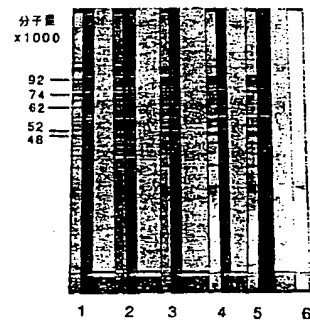


FIG. 4

【图5】

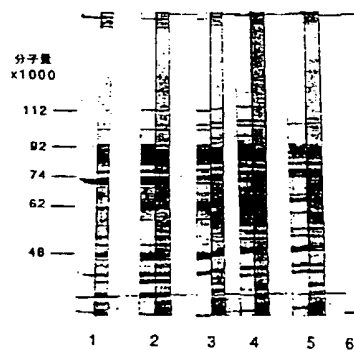


FIG. 5

【图6】

| 10          | 20         | 30          | 40         | 50          |      |
|-------------|------------|-------------|------------|-------------|------|
| 1234567890  | 1234567890 | 1234567890  | 1234567890 | 1234567890  |      |
| ATGAAAAA    | TGCCACTATA | CCAGAGGAAA  | GAGCAGTATA | TAAAATPAIT  | 50   |
| AAAATTACAT  | TTTCTTCATT | TGCGCCAGAA  | TTTTAAGAA  | TTAGTACATT  | 100  |
| AAAAAGTAGA  | ACAAAAGTTA | TTAATGTAAA  | CATTAGCCCA | ATCCTTAAGA  | 150  |
| AAAAATTAAA  | AGTTTATCT  | ATTTTITTA   | ATCGAATCC  | AACCAGGCAT  | 200  |
| AAATCTTTGT  | CAGTATTTAT | CAATGCGGTA  | TTTTTCATT  | ATTCTACTA   | 250  |
| AAATATTTAT  | TGAATTTGCA | TTTTCCATA   | TCTAAATTT  | TACATTTTT   | 300  |
| TATAACCAAT  | TTTAAAAAT  | ACTCTTTAAT  | TTATAGTATT | TTTTATTTT   | 350  |
| TTAGTCTAAA  | TTATAAAAT  | ATCTTGAATT  | TTATTGAAT  | TTTTATATT   | 400  |
| TAGTACTAAA  | AAATACAAAT | ATTTTTCCTT  | ATTCATAGAA | AAATTCATTT  | 450  |
| TTTAAAAAAA  | ATTGATTTT  | ATAGTATAAT  | TTGTTCTAT  | AATGTAATTA  | 500  |
| ACTTGATTG   | AAAGGGAACA | AAATGAAAA   | AATGCTTAGA | AAAAATCTT   | 550  |
| TSTATTCATC  | AGCTTTTAT  | GCACTTCGC   | TTGCTCAAT  | TATTGCATTT  | 600  |
| GTTGCAGCAG  | GTTGTGGACA | GACAGAACTA  | GCTTCAACTT | CTGATTCATA  | 650  |
| ACCACAGGCC  | GAGACGCTAA | AACATAAAGT  | AAGTAATGAT | TCTATTCGAA  | 700  |
| TAGCACTAAC  | CGATCCGGAT | AATCTCGAT   | GAATTAGTGC | CCAAAAAGAT  | 750  |
| ATTATTTCTT  | ATGTTGATGA | AACAGAGGCA  | GCAACTTCAA | CAATTACAAA  | 800  |
| AAACCAGGAT  | GCACAAATA  | ACTGACTCAC  | TCAGCAAGCT | AATTTAAGCC  | 850  |
| CAGCGCCAAA  | AGGATTTAT  | ATTGCCCCG   | AAAATGGAAG | TGGAGTTGGA  | 900  |
| ACTGCTGTTA  | ATACAAATGC | TGATAAGGA   | ATTCCGATTG | TTGCCATGA   | 950  |
| TCGACTAATT  | ACTGGATCTG | ATAAATATGA  | TTGGTATGTT | TCTTTTGATA  | 1000 |
| ATGAAAAGT   | TGGTGAATTA | CAAGGTCTTT  | CACTTGCTCC | GGGTCTATTA  | 1050 |
| GGAAAGAGAG  | ATGGTGCTTT | TGATTCATTT  | GATCAAATGA | ATGAATATCT  | 1100 |
| AAAAATCAGAT | ATGCCCCAAG | AGACAAATTC  | TTTTTATACA | ATCGCGGGTT  | 1150 |
| CCCAAGATGA  | TAAATATTC  | CAATATTTT   | ATAATGGTGC | AATGAAGTAA  | 1200 |
| CTTAAAGAAAT | TAAATGAAAA | TTCCGAAAA   | AAAATAATTG | ATTATCTCC   | 1250 |
| TGAAGGCGAA  | AATGCTGTTT | ATGCCCAGG   | ATGAATTTAT | GGAACTGCCG  | 1300 |
| GTCAPAGAAAT | CCAATCTTTT | CTAACAAATTA | ACAAAGATCC | AGCAGGTGGT  | 1350 |
| AAATAAATCA  | AAGCTGTGTT | TTCAAAACCA  | GCTTCTATTT | TCAPAGGATT  | 1400 |
| TCCTTGCCCCA | AATGATGGAA | TGGCCGAAAC  | AGCAATCACC | AAATTAAAC   | 1450 |
| TTGAAGGGTT  | TGATACCCAA | AAATCTTTT   | TAATCTGTCA | AGATTATAAT  | 1500 |
| GATAAAGCCA  | AACTTTTAT  | CAAAGACGGC  | GATCAAAATA | TGACAAATTA  | 1550 |
| TAAACCTGAT  | AAAGTTTTAG | AAAAGTTG    | TGTTGAAGTT | CTCGGGTTT   | 1600 |
| TAATTGCAAA  | GAATAATAA  | GCACTAGAT   | CAGAAGTCCA | AAACGAACATA | 1650 |
| AAAGCAAACT  | TACCAATAT  | TTCATTTAA   | TATGATAATC | AAACATATAA  | 1700 |
| AGTACAGCT   | AAAAATATTA | ATACAAATTT  | AGTAAGTCCA | GTAATTGTAA  | 1750 |
| CAAAAGCTAA  | TGTTGATAAT | CCTGATGCTT  | AA         |             | 1782 |

FIG. 6

【图7】

| 10         | 20         | 30         | 40         | 50          |     |
|------------|------------|------------|------------|-------------|-----|
| 1234567890 | 1234567890 | 1234567890 | 1234567890 | 1234567890  |     |
| MKKMLRKKFL | YSSAIYATSL | ASIIATVAAG | CGOTESGSTS | DSKPQATLK   | 50  |
| HKVSNDSIRI | ALTDPDNPRW | ISAOKDIISY | VDTEAATST  | ITKNQDAQNN  | 100 |
| WLTQGANLSP | APKGFIIAPE | NGSGVGTAVN | TIADKGIPIV | AYDRLITGSD  | 150 |
| KYDNYVSFDN | EKVGELOGLS | LAAGLLGKED | GAFDSIDQMN | EYLKSHMPQE  | 200 |
| TISFYTIAGS | QDDNNSQYFY | NGAMKVLKEL | MKNSQNKIID | LSPEGNAVY   | 250 |
| VPGWNYGTAG | QRIQSFLTIN | KDPAGGNKIK | AVGSKFASIF | KGFLAPNDGM  | 300 |
| AEQAITHKLK | EGFDTQKIFV | TRQDYNDKAK | TFIKDGDQNM | TIYKPKDKVLG | 350 |
| KVAVEVLRVL | IAKQNKASRS | EVENELKAKL | PNISFKYDNO | TYKVOGKNIN  | 400 |
| TILVSPVIVI | KANVDNPDAA |            |            |             | 419 |

FIG. 7

## フロントページの続き

| (51) Int. Cl. <sup>6</sup> | 識別記号  | F I           |       |
|----------------------------|-------|---------------|-------|
| C 0 7 K 16/12              |       | C 0 7 K 16/12 |       |
| C 1 2 N 15/01              |       | C 1 2 P 21/02 | C     |
| C 1 2 P 21/02              |       | G 0 1 N 33/53 | Z     |
| G 0 1 N 33/53              |       | 33/531        | A     |
| 33/531                     |       | 33/543        | 5 9 7 |
| 33/543                     | 5 9 7 | 33/569        | F     |
| 33/569                     |       | C 1 2 P 21/08 |       |
| // C 1 2 P 21/08           |       | C 1 2 N 15/00 | E     |
| (C 1 2 N 15/09             |       |               |       |
| C 1 2 R 1:35)              |       |               |       |

(81) 指定国 EP(AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AP(KE, LS, MW, SD, SZ, UG), UA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), AL, AM, AT, AU, AZ, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, HU, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN

(72) 発明者 ダウテイ、スチーブン・ウィリアム  
オーストラリア・ビクトリア3130ブラツク  
バーン・ダイアナドライブ1エイ

## 【要約の続き】

e) 感染に対するワクチン組成物の製剤の際のそれらの使用をも含む。

## 【国際調査報告】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.  
PCT/AU 96/00149

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**

Int Cl<sup>6</sup>: C07K 16/12; C12N 15/31; C12P 21/00, 21/02, 21/08; G01N 33/53, 33/531; A61K 39/04; C07K 14/30

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

**B. FIELDS SEARCHED**

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
IPC As Above

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched  
AU: IPC As Above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)  
WPAT, BIOT, JAPIO: MYCOPLASM: AND ANTIGEN#  
CASM: MULTI-SEQUENCES

**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages   | Relevant to claim No.        |
|-----------|--|------------------------------|
| X         | AU,A, 70685/87 (CETUS CORP) 1 October 1987<br>Example 1, Claims                      | 1,16,17,20-23,33<br>35-37,43 |
| X         | AU,B, 49035/90 (640364) (UNIVERSITY OF MELBOURNE et al)<br>11 October 1990<br>Claims | 1,2,16,20,22                 |
| X         | AU,A, 76820/91 (SYNERGEN, INC.) 17 October 1991<br>Fig. 1, 4, 6 and 7, Claim 3       | 14,38,39,41,42               |

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C

☒ See patent family annex

|  |  |   |
|--|--|---|
| <p>* Special categories of cited documents:</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"I" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> |  | <p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance, the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</p> <p>"Y" document of particular relevance, the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</p> <p>"&amp;" document member of the same patent family</p> |
|--|--|---|

Date of the actual completion of the international search  
6 May 1996

Date of mailing of the international search report  
15.05.96

Name and mailing address of the ISA/AU  
AUSTRALIAN INDUSTRIAL PROPERTY ORGANISATION  
PO BOX 200  
WODEN ACT 2606  
AUSTRALIA Facsimile No.: (06) 285 3929

Authorized officer  
  
BARRY SPENCER  
Telephone No.: (06) 283 2284

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/AU 96/00149

| C (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT |   |   |
|--|---|---|
| Category*  | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages  | Relevant to claim No.                           |
| PX   | AU,A, 17602/95 (SYNERGEN, INC.) 26 October 1995<br>Fig. 1, 4, 6 and 7 P 13 L14-P14 L5   | 14,38,39,41,42                                  |
| X  | AU,B, 49599/90 (638970) (AUSPHARM INTERNATIONAL LTD.) 26 July 1990<br>Examples 4 and 5  | 16,17,20,21,35                                  |
| X  | US,A, 4894332 (SCHALLER et al) 16 January 1990<br>Examples  | 1,2,14,16,17,<br>20-22,24,33,<br>35,37-39,41,42 |
| X  | US,A, 5252328 (FAULDS et al) 12 October 1993<br>Examples 1 to 4   | 1-17,20-23,<br>33-35,37                         |
| X  | US,A, 5240706 (FAULDS) 31 August 1993<br>Examples 1 and 2, Claims   | 1-6,14-16,21<br>22,24,25,33-35<br>37,38,41,42   |
| X  | EP,A, 0475185 (NIPPON FLOUR MILLS CO., LTD.)<br>Refer Example 1, Claims   | 1-6,12-17,<br>20-23,33-35,<br>37-39,41,42       |
| PX   | Journal of Bacteriology, Vol. 177, No. 7, April 1995, pp1915-1917, "Molecular Cloning of a 46-Kilodalton Surface Antigen (P46) Gene from <u>Mycoplasma hyopneumoniae</u> : Direct evidence of CGG Codon Usage for Arginine", Futo et al   | 3-6,12-15,24<br>25,31,32,38,<br>39,41,42        |
| PX   | Journal of Clinical Microbiology, Vol. 33, No. 3, March 1995, pp 680-683, "Recombinant 46-Kilodalton Surface Antigen (P46) of <u>Mycoplasma hyopneumoniae</u> Expressed in <u>Escherichia Coli</u> Can Be Used for early Specific Diagnosis of Mycoplasmal Pneumonia of Swine by Enzyme-Linked Immunosorbent assay", Futo et al | 3-6,<br>12-15,38,39,<br>41,42                   |
| X  | Infection and Immunity, Vol. 49, No. 2, pp329-335, "surface Proteins of <u>Mycoplasma hyopneumoniae</u> Identified from an <u>Escherichia coli</u> Expression Plasmid Library", Klinkert et al  | 3-6,12-15,38<br>39,41,42                        |
| A  | EP,A, 0571648 (WENG) 1 December 1993  |   |
| A  | Derwent abstract Accession No. 88-010509, Class 503, JP,A, 62-273455 (NORIINSHO KK) 27 November 1987  |   |
| A  | Derwent Abstract Accession No. 90-241949, Class 503, JP,A, 02-167079 (NIPPON SEIFUN KK) 27 June 1990  |   |
| A  | Derwent abstract Accession No. 95-203749, Class B04, C06, D16, JP,A, 07-118167 (ZENKOKU NOGYO KYODO KUMIAI RENGOKAI) 9 May 1995   |   |

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1992) copjhw

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.  
PCT/AU 96/00149

This Annex lists the known "A" publication level patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The Australian Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.

| Patent Document Cited in Search Report |          |    |          | Patent Family Member |          |    |         |
|--|----------|----|----------|----------------------|----------|----|---------|
| AU                                     | 87/70685 | EP | 254384   | JP                   | 63000298 |    |         |
| AU                                     | 90/49035 | AT | 134386   | BR                   | 9000451  | CA | 2008808 |
|  |          | CN | 1046188  | DE                   | 69025414 | EP | 381427  |
|  |          | FI | 900498   | IL                   | 93234    | JP | 3087199 |
|  |          | NO | 178893   | NZ                   | 232279   | ZA | 9000766 |
| AU                                     | 91/76820 | AU | 17602/95 | CA                   | 2078131  | EP | 527771  |
|  |          | FI | 924428   | HU                   | 65827    | JP | 5506984 |
|  |          | NO | 923828   | WO                   | 9115593  | US | 5459048 |
|  |          | AT | 135048   | AU                   | 622855   | DE | 3751727 |
|  |          | DK | 1608/88  | EP                   | 315637   | HU | 208550  |
|  |          | IL | 83324    | JP                   | 1503735  | WO | 8800977 |
| AU                                     | 95/17602 | AU | 76820/91 | CA                   | 2078131  | EP | 527771  |
|  |          | FI | 924428   | HU                   | 65827    | JP | 5506984 |
|  |          | NO | 923828   | WO                   | 9115593  | US | 5459048 |
|  |          | AT | 135048   | AU                   | 622855   | DE | 3751727 |
|  |          | DK | 1608/88  | EP                   | 315637   | HU | 208550  |
|  |          | IL | 83324    | JP                   | 1503753  | WO | 8800977 |
| AU                                     | 90/49599 | EP | 454735   | NZ                   | 232190   | WO | 9007935 |
|  |          | ZA | 9000474  |                      |          |    |         |
| US                                     | 4894332  | CA | 1301677  | CN                   | 86102858 | EP | 196215  |
|  |          | JP | 61274687 |                      |          |    |         |
| END OF ANNEX                           |          |    |          |                      |          |    |         |



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/AU 96/00149

This Annex lists the known "A" publication level patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The Australian Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.

| Patent Document Cited in Search Report |         |    |          | Patent Family Member |          |    |         |
|--|---------|----|----------|----------------------|----------|----|---------|
| US                                     | 5252328 | CA | 1321142  | CN                   | 88101554 | DK | 1674/88 |
|  |         | EP | 283840   | HU                   | 203672   | IE | 61626   |
|  |         | JP | 63258427 | PT                   | 87041    |    |         |
| US                                     | 5240706 | AT | 134705   | DE                   | 68925769 | EP | 359919  |
|  |         | JP | 2291271  |                      |          |    |         |
| EP                                     | 475185  | JP | 5091882  |                      |          |    |         |
| END OF ANNEX                           |         |    |          |                      |          |    |         |

【公報種別】特許法第17条第1項及び特許法第17条の2の規定による補正の掲載

【部門区分】第1部門第1区分

【発行日】平成11年（1999）8月17日

【公表番号】特表平11—501809

【公表日】平成11年（1999）2月16日

【年通号数】

【出願番号】特願平8—527121

【国際特許分類第6版】

C12N 15/09

A61K 39/00 ADX

39/395 ABE

ACD

C07K 14/30 ZNA

16/12

C12N 15/01

C12P 21/02

G01N 33/53

33/531

33/543 597

33/569

// C12P 21/08

(C12N 15/09

C12R 1:35 )

【F I】

C12N 15/00 A

A61K 39/00 ADX J

39/395 ABE N

ACD D

C07K 14/30 ZNA

16/12

C12P 21/02 C

G01N 33/53 Z

33/531 A

33/543 597

33/569 F

C12P 21/08

C12N 15/00 E

手続補正書

請求の範囲

平成10年10月30日

特許庁長官 伊佐山 建 忠 殿

1. 事件の表示

平成8年特許願第527121号

2. 補正をする者

事件との関係 特許出願人

名称 ファイザー・インコーポレイテッド

3. 代理人

〒197 0052

住所 東京都港区赤坂1丁目9番15号

H 本 白 花 車 公 館

氏名(6078)井田士 小田島 平 吉

(ほか1名)

電話 3585-2256

4. 補正命令の日付 なし(自発)

5. 補正の対象

請求の範囲

6. 補正の内容

別紙のとおり



4. 72～75kD領域内の抗原が以下のN-末端アミノ酸配列:

AGXLQKNSLLEEVWYAL

を含む、請求項2に記載の仮想的防御抗原。

4. 以下の内部アミノ酸配列:

AKNFDFAPSIQGYKKIAHEL

NLKPEQILQLLG

LLKAEXNIXIEINTXLON

の内の一つもしくは複数の更に含む、請求項2に記載の仮想的防御抗原。

5. 60～64kD領域内の抗原が以下のN-末端アミノ酸配列:

MKLAKLLKGFX(N/L)(M/V)IK

ADP(F/I)(R/E)Y(V/A)PQG(Q/A)X(M/N)VG

を含む、請求項2に記載の仮想的防御抗原。

6. 52～54kD領域内の抗原が以下のN-末端アミノ酸配列:

AGXWAKETKEEKS

を含む、請求項2に記載の仮想的防御抗原。

7. 以下の内部アミノ酸配列:

AWWTADGTVN

AIWTDGTVNDNKPQWVRKY

の内の一つもしくは複数の更に含む、請求項6に記載の仮想的防御抗原。

8. 46～48kD領域内の抗原が以下のN-末端アミノ酸配列:

AGXGQTESGSTSDSKPQAECLKHKV

を含む、請求項2に記載の仮想的防御抗原。

f1. マイコプラズマ(Mycoplasma)の試料:

マイコプラズマ(Mycoplasma)に対する少なくとも抗体であって、

免疫動物を、感染部位もしくは病変領域または感染部位もしくは病変に近接する領域から採取されたマイコプラズマ(Mycoplasma)もしくはマイコプラズマ(Mycoplasma)抽出物で攻撃誘発させた後、短時間の内に採取された生物学的試料を採集し;

その生物学的試料から細胞を単離し;

細胞を適切な培養媒体中でインビトロで培養し;そして

前記細胞から抽出された抗体を回収することを含む方法により産生された、

抗体を含む抗体プローブを提供し;

そのマイコプラズマ(Mycoplasma)の試料を前記抗体プローブで検索して少なくとも一つの抗原を抽出し;そして

抽出された抗原を単離することを含む方法により調製されるマイコプラズマ(Mycoplasma)に対する仮想的防御抗原。

2. 本明細書中に記載される110～114、90～94、72～75、60～64、52～54、および46～48キログラム(kD)のおおよその分子量を有する抗原群より選択されるマイコプラズマ ヒオプネウモニアエ(Mycoplasma hyopneumoniae)もしくは関連感染型に対する仮想的防御抗原、その突然変異体、誘導体、および断片。

9. 以下の内部アミノ酸配列:

TIYKPKVLGKVAVEVLRVLAKKNKASR

AEQAITKLKLEGFTDQ

KNSQNKIIDLSPG

の内の一つもしくは複数の更に含む、請求項8に記載の仮想的防御抗原。

10. マイコプラズマ ヒオプネウモニアエ(Mycoplasma hyopneumoniae)もしくは関連感染型に対する仮想的防御抗原をコードし、以下の配列、その突然変異体、誘導体、誘導体、および断片を含む塩基配列断片。

| 10         | 20          | 30          | 40          | 50         |
|------------|-------------|-------------|-------------|------------|
| 1234567890 | 1234567890  | 1234567890  | 1234567890  | 1234567890 |
| ATGAAAGAAA | TGCACATAA   | CCAGAGGAAA  | GAGCAGTATA  | TAAAAAATTT |
| AAAATTACAT | TTTCTTCATT  | TGGCGCGAAA  | TTTTTAAGAA  | TTAGTACATT |
| AAAAAGTAGA | ACAAAAGTTA  | TAAATGTAAA  | CATTAGCGCA  | ATCGTTAACA |
| AAAAATTAAT | AGTTTATCT   | ATTTTITTTA  | ATCGAATTCG  | AACGAGGCAT |
| AAATCTTTGT | CAGTATTAT   | GAGTGGGTTA  | TTTTTTCATT  | ATTTCGACTA |
| AAATATTATT | TGAATTTTGA  | TTTTCATATA  | TCIAAAATTT  | TACATTTTTT |
| TATAACAATT | TTTAAAAATT  | ACTCTTTTAT  | TTATAGTATT  | TTTTTATTTT |
| TTAGTCTAAA | TTATAAAATT  | ATCTTGAATT  | TTATTGAAAT  | TTTTTATAAT |
| TAGTACTAAA | AAATACAAAT  | ATTTTTCCTT  | ATTCIAAGAA  | AAATTCATTT |
| TTTAAAAAAA | ATTGATTTT   | ATAGTATAAT  | TTTCTGTAT   | AAATGAATTA |
| ACTTGATTGG | AAAGGGAACA  | AAATGAAGAA  | AATGCTTAGA  | AAAAAATTC  |
| TGTATTGATC | AGCTATTAT   | GCACTTTCGG  | TTGCATCAAT  | TATTCGATT  |
| CTTGACAGAG | OTTETGGACA  | GACAAATGA   | GGTTGAAGTT  | CTGATTCTAA |
| ACCAGAAAGC | GAGAGGCTAA  | ACATAAAGT   | AAGTAATGAT  | TCTATTGAAA |
| TAGCAGTAC  | CGATCCGAT   | AATGCTGAT   | CAATTAAGT   | CGAAAAAGAT |
| ATTATTCTTT | ATGTTGATGA  | AACAGAGGCA  | GCAACTTCAA  | CAATTACAAA |
| AAACAGGAT  | CCACAAATTA  | ACTGATCCAC  | TCAGCAAGCT  | AAATTAAGCC |
| CAGCGCCAAA | AGGATTATT   | ATTGCCCTTG  | AAATGGAAAG  | TGGAGTTGGA |
| ACTGCTGTTA | ATACATTTGC  | TGATAAGGA   | ATCCGATTTG  | TTGCTTATGA |
| TGACTAATT  | ACTGATCTGA  | ATAAATATGA  | TTGCTATGTT  | TCCTTTGATA |
| ATGAAAAAGT | TGGTGATTTA  | CAAGCTCTTT  | CACTTCTCTC  | CGCTCTATTA |
| GGAAAAAGAG | ATGCTGCTTT  | TGATCAATT   | GATCAATATGA | ATGAATATCT |
| AAATCATCAT | ATGCCCCAAG  | AGACATTTTC  | TTTTTATACA  | ATCCCGGGTT |
| CCCAAGATGA | TATATAATTC  | CAATATTTT   | ATAAGGTTGC  | AATGAAAGTA |
| CTTAAAGAT  | TATGAAAAA   | TTGCCAAAT   | AAATATTTTG  | ATTATCTCC  |
| TGAAGGCGAA | ATGCTGTTT   | ATGCTCCAGG  | ATGAATTTAT  | GGAAGTGGCG |
| GTCAAGGAAT | CCAATCTTT   | CTAACAAATTA | ACAAGATCTG  | AGCAGGTGGT |
| AATAAATCAT | AAGCTGTGTTG | TTCAAAAGCA  | GCCTTATTTT  | TCAAGGGAAT |
| CTCTGCCCCA | AATGATGGAA  | TGGCGGAAAC  | AGCAATCAC   | AAATTAAGAC |
| TTGAAGGGTT | TGATACCCAA  | AAAATCTTGT  | TACTCTGCTA  | AGATATAAT  |
| GATAAAGCCA | AAATTTTAT   | CAAGACCGGC  | GATCAAAATA  | TGACATTTTA |
| TAAAGCTGAT | AAAGTTTATG  | GAAAGTTTGC  | TGTTGAAGTT  | CTTCGGTTTT |
| TAAATGCAAA | TAAATGCAAT  | CAGAGTCCAT  | CAGAGTCCAT  | AAACCAACTA |
| AAAGCAAAAC | TACCAATAT   | TTCAATTAAT  | TATGATATC   | AACCAACTA  |
| AGTACAGGT  | AAAAATATTA  | ATACAAATTT  | AGTAACTCCA  | GTAATTTGTA |
| CAAAAGCTAA | TGTTGATTAAT | CTGATGCTCT  | AA          | 1782       |

1.1. 免疫動物を、感染部位もしくは病変領域または感染部位もしくは病変に近接する領域から採取されたマイコプラズマ (*Mycoplasma*) もしくはマイコプラズマ (*Mycoplasma*) 抽出物で攻撃誘発させた後、短時間の内に採取した生物学的試料を提供すること。

1.7. マイコプラズマ (*Mycoplasma*) の試料：およびマイコプラズマ (*Mycoplasma*) に対する少なくとも一つの抗体を含む抗体プローブ；を提供し；前記抗体プローブでマイコプラズマ (*Mycoplasma*) の試料を探索して少なくとも一つの抗原を検出し；そして検出された抗原を単離することを含む、マイコプラズマ (*Mycoplasma*) 若しくはマイコプラズマ ヒオプネウモニアエ (*Mycoplasma hyopneumoniae*) に関連する仮想的防御抗原の同定方法。

1.8. 精製抗原混合物：および適切な支持体に固定化された、マイコプラズマ (*Mycoplasma*) に対する抗体を提供し；その粗製抗原混合物を、固定化させた抗体を用いる顕微鏡クロマトグラフィーに供し；そしてそのようにして形成された精製抗原を単離することを含む、マイコプラズマ (*Mycoplasma*) 若しくはマイコプラズマ ヒオプネウモニアエ (*Mycoplasma hyopneumoniae*) に関連する仮想的防御抗原の精製方法。

1.9. マイコプラズマ (*Mycoplasma*) の試料に由来するcDNAライブラリーもしくはゲノムライブラリー；および請求項1に従って調製される抗体を含む抗体プローブ；を提供し；

その生物学的試料から細胞を単離すること；

細胞を適切な培養基培地でインビトロで培養すること；および

前記細胞から発生される抗体を回収することを含む、マイコプラズマ (*Mycoplasma*) に対する抗体の発生方法。

1.2. 生物学的試料が、マイコプラズマ (*Mycoplasma*) で動物を攻撃誘発させた後の約2〜7日に採取される、請求項1.1に記載の方法。

1.3. 細胞のインビトロでの培養が更に、その培養物へのヘルパー因子の添加を含む、前記ヘルパー因子は単独もしくは組み合わされて用いられるインターロイキン1、2、3、4、5、6、7、および8、コラーゲン化因子、インターフェロンを含むサイトカイン、ならびに特異的細胞分化の促進効果を有することが示されることがある他の因子から選択される、請求項1.1または1.2に記載の方法。

1.4. 抗体を増殖、および分泌および/または放出させる目的で単離された細胞を活性化させることを含む細胞活性化段階を更に含む、

前記細胞活性化段階は、培養培地に細胞活性化剤を添加することを含む、前記細胞活性化剤は本明細書に記載されるようにマイトジェンおよび白血球により産生されるヘルパー因子、またはそれらの合成等価物もしくは組み合わせた物を含む群から選択される、請求項1.1〜1.3の内のいずれか一つに記載の方法。

1.5. 抗体が、培養培地から回収された一滴の形態にある、請求項1.1〜1.4の内のいずれか一つに記載の方法。

1.6. 請求項1.1〜1.5の内のいずれか一つの方法に従って調製されるマイコプラズマ (*Mycoplasma*) に対する抗体。

そのcDNAライブラリーもしくはゲノムライブラリーから合成ポリペプチドを作製し；

その合成ポリペプチドを抗体プローブで検出し；そして

それによって検出された合成抗原性ポリペプチドを単離することを含む、マイコプラズマ (*Mycoplasma*) 若しくはマイコプラズマ ヒオプネウモニアエ (*Mycoplasma hyopneumoniae*) に対する合成抗原性ポリペプチドの調製方法。

2.0. 抗体プローブが、本明細書に記載される110〜114、90〜94、72〜75、60〜64、52〜54、および46〜48キログラム (kD) のおおよその分子量を有する抗原、その天然変異体、断片、および断片の群から選択されるマイコプラズマ ヒオプネウモニアエ (*Mycoplasma hyopneumoniae*) もしくは関連感染源に対する抗原に対して作製される抗体を含む、請求項1.9に記載の方法。

2.1. 請求項1.9もしくは2.0に記載の方法により産生される合成仮想的防御抗原。

2.2. 請求項2〜9の内のいずれか一つに記載のマイコプラズマ (*Mycoplasma*) に対する少なくとも一つの仮想的防御抗原の予防的有効量を含むワクチンもしくは獣医学的組成物。

2.3. 複数の仮想的防御抗原を含む、請求項2.2に記載のワクチンもしくは獣医学的組成物。

2.4. 請求項1.6に記載のマイコプラズマ (*Mycoplasma*) に対する抗体を含むワクチンもしくは獣医学的組成物。

2.5. 請求項2〜9の内のいずれか一つに記載される診断用抗原も

しくはその断片を含む診断用キット。

26. マイコプラズマ (Mycoplasma) 感染を予防もしくは治療するための、請求項2-9の内のいずれか一つに記載の少なくとも一つの仮想的防御抗原の予防的もしくは治療的有效量の使用方法。

27. マイコプラズマ (Mycoplasma) もしくは関連感染源に対する仮想的防御抗原をコードし、図6に記載の核酸配列もしくは相同配列、およびその機能的活性断片、突然変異体、変異体、もしくは複製体を有する単離されたDNA断片。

28. 請求項27に記載のDNA断片を含むクローン。

29. クローンpC1-2である、請求項28に記載のクローン。

30. 請求項27に記載のDNA断片によりコードされるアミノ酸配列もしくはその機能的等価物。

31. 図7のアミノ酸配列を有するアミノ酸配列もしくはその機能的等価物。」